

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

*Χαρακτηρισμός και δυναμική έκφραση του γονιδίου
CYP450 της οικογένειας 71A από την ελιά*



ΣΚΟΥΦΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Αθήνα 2014

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της 13^{ης} ΓΣΕΣ του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (07-06-2013) κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή:

1. Καθηγητής Χατζόπουλος Πολυδεύκης (Επιβλέπων)
2. Επίκουρη Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα (Μέλος)
3. Επίκουρος Καθηγητής Μπανίλας Γεώργιος (Μέλος)

Αντί προλόγου

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης. Επίσης καταλυτικό ρόλο είχαν και οι συμβουλές που δέχτηκα από τον Επίκουρο Καθηγητή Μπανίλα Γεώργιο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κουδουνά Κωνσταντίνο για την υπομονή του, τις εποικοδομητικές συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθεια του και στήριξη από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Μιχαηλίδη Χρήστο για την παροχή θεωρητικής και τεχνικής στήριξης κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, ανεξαιρέτως, για την βοήθεια τους και για το κλίμα συναδελφικότητας που επικρατεί στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ηθική τους στήριξη. Χωρίς τη συμπαράσταση τους θα ήταν δύσκολη η πραγματοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. ΕΛΙΑ (<i>Olea europaea</i> L.).....	8
1.1 Προέλευση της ελιάς	8
1.2 Μορφολογία της ελιάς.....	9
1.4 Καλλιέργεια της ελιάς.....	10
2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ.....	11
2.1 Σύνθεση συστατικών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες στα διάφορα μέρη της ελιάς	13
2.1.1 Ελαιόκαρπος	13
2.1.2 Ελαιόλαδο	16
2.1.3 Φύλλα ελιάς	18
2.2 Βιοσύνθεση και καταβολισμός των βιοφαινολών της ελιάς	19
3. ΧΡΩΜΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ: ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΑ	23
3.1 Τα κυτοχρώματα P-450	24
3.1.1 Ονοματολογία	26
3.1.2 Η μοριακή δομή των κυτοχρωμάτων P450	28
3.1.3 Ο μηχανισμός των P 450 καταλυόμενων αντιδράσεων	31
4. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ 71Α ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ P450 ΚΑΙ Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	42
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA) ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	42
3. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΜΕ DNAση.....	43
4. ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ –RT	44
5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	45
5.1. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	45
5.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων	47
5.3. Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	47
5.4. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού	48

6. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ.....	49
6.1 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα	49
6.2 Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	49
6.3 Δημιουργία βακτηριακών δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> για χημικό μετασχηματισμό	50
6.4 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα.....	51
7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	52
7.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i>	52
7.2 Μέθοδος αλκαλικής λύσης	52
8. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	53
8.1 Η μέθοδος της PCR.....	53
8.2 Σχεδιασμός εκκινητών	56
8.3 RACE-PCR: RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS.....	57
9. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	58
9.1 Σύστημα έκφρασης <i>pET</i>	58
9.2 Σύστημα έκφρασης <i>pQE</i>	60
9.3 Επαγωγή της έκφρασης	62
10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	63
10.1 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (<i>SDS- PAGE, SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)	63
10.2 Χρόση των πρωτεϊνών.....	66
10.3 Ανοσοαποτύπωση κατά <i>Western (Western blot)</i>	66
10.4 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη (<i>Western transfer</i>).....	67
10.5 Αλληλεπίδραση μεμβράνης με εξειδικευμένα αντισώματα.....	68
10.6 Ανίχνευση σήματος.....	70
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
1. ΦΥΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	72
2. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ 3' ΑΚΡΟΥ ΤΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ 3'RACE- PCR	75
2.1 Αντιδράσεις 3' RACE-PCR.....	76

2.2 Σχεδιασμός εκκινητών από τις 5' και 3' αμετάφραστες περοχές	82
3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	87
4.ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ CYP71A ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	92
4.1 Δημιουργία των κατασκευών έκφρασης	92
4.2 Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης CYP71A-Olea σε βακτηριακά κύτταρα	97
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	108
Περίληψη.....	115
Abstract	116
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΛΙΑ (*Olea europaea* L.)

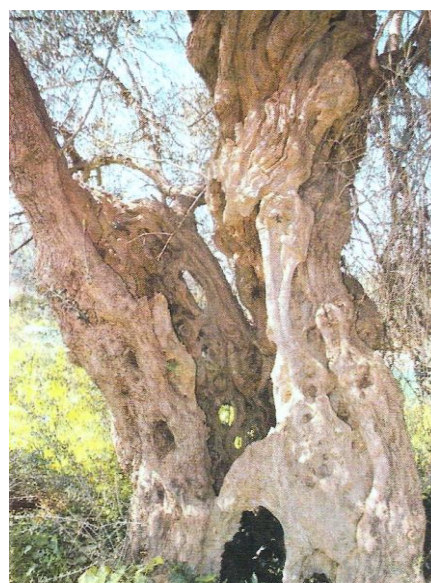
1.1 Προέλευση της ελιάς

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τουλάχιστον 30-35 είδη που ανήκουν στην οικογένεια Oleaceae, της υποοικογένειας *Oleoideae* ($x=23$). Η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* L.) είναι αείφυλλο δέντρο που προήλθε από τροπικά και υποτροπικά είδη. Η καλλιέργεια της ελιάς είναι ήδη γνωστή από το 4800 π.Χ. στην Κύπρο. Η ηλικία του δέντρου μπορεί να εξηγήσει τη μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών του. Αξιόλογη γενετική παραλλακτικότητα υφίσταται και μεταξύ φυτών της ίδιας ποικιλίας.

Οι περισσότερες καλλιέργειες ελιάς ανήκουν στο είδος *Olea europaea* L. με $2x=46$ χρωμοσώματα.

Olea europaea	euromediterranea	sativa (καλλιεργούμενη ελιά)
		oleaster (άγρια ελιά)
	laperrini	var. typical
		var. cyrenaica
		var. maireana
cuspidata		

Το είδος *Olea europaea* L. απαρτίζεται από πολλές ομάδες και από 2600 ποικιλίες, πολλές από τις οποίες μπορεί να είναι μόνο οικότυποι. Η *Olea europaea* L. δε φαίνεται να είναι είδος αλλά μια ομάδα από μορφές, που προήλθαν από μετάλλαξη και υβριδισμό (Θέρσιος, 2005).



Πιν. 1: Τα υποείδη της ευρωπαϊκής ελιάς (*Olea europaea* L.)

Εικ. 1: Κορμός από υπεραιώνια ελιά με μεγάλη ικανότητα αναβλάστησης.

1.2 Μορφολογία της ελιάς

Η ελιά είναι δέντρο αιωνόβιο, αποκτά ύψος 15-20μ., στη πράξη όμως με το κλάδεμα αποκτά ύψος 4-5μ.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ριζών βρίσκεται σε βάθος 60-70 εκατοστά. Το ριζικό σύστημα έχει την τάση να αναπτύσσεται οριζόντια παρά κάθετα. Οι χοντρές ρίζες συνήθως απαντώνται στα πρώτα 20εκατοστά.

Σε ξηρές περιοχές το ριζικό σύστημα επεκτείνεται μέχρι να καλύψει επιφάνεια 7-8 φορές μεγαλύτερη από την επιφάνεια του φυλλώματος του δέντρου.



Εικ.2: Το ριζικό σύστημα της ελιάς.



Εικ. 3: Ταξιανθία ελιάς προ της άνθησης και στο στάδιο της άνθησης.

Ο κορμός του νεαρού δέντρου είναι κυλινδρικός και λείος αλλά με την πάροδο του χρόνου γίνεται ανομοιόμορφος και φέρει πολλά εξογκώματα (ρόζους).

Τα άνθη εμφανίζονται σε ταξιανθίες βότρυος οι οποίες σχηματίζονται στις μασχάλες των φύλλων ή στην κορυφή των βλαστών. Είναι μικρά, ερμαφρόδιτα και υπόγυνα και



Εικ.4: Τα μέρη του δέντρου της ελιάς

Τα φύλλα είναι μικρά, λογχοειδή, πράσινα στην πάνω και φαιά στην κάτω επιφάνεια τους. Τα χαρακτηριστικά των φύλλων και κυρίως τα στόματα και οι τρίχες χρησιμεύουν για την διάκριση των ποικιλιών.

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, σφαιρική ή ελλειψοειδής και αποτελείται από το φλοιό (περικάρπιο), τη σάρκα (μεσοκάρπιο), τον πυρήνα (ενδοκάρπιο) και το σπέρμα μέσα στο ενδοκάρπιο. Το χρώμα του καρπού είναι πράσινο και μεταβάλλεται σε πρασινοκίτρινο, ιώδες ως μελανοιώδες κατά την πλήρη ωρίμανση, ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας. Το μέγεθος του εξαρτάται από την ποικιλία, την γονιμότητα του εδάφους, τον αριθμό καρπών ανά δέντρο, την διαθεσιμότητα νερού και τις καλλιεργητικές τεχνικές (Θέριος,2005).

1.3 Αύξηση και ανάπτυξη

Η άνθηση καθορίζει την έναρξη της κύριας περιόδου αποκοπής ανθέων ή καρπών, που διαρκεί 6 εβδομάδες μετά την πλήρη άνθηση. Το τέλος αυτής της περιόδου αποκοπής συμπίπτει με τη σκλήρυνση του ενδοκαρπίου και με την ταχεία ανάπτυξη του εμβρύου. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι η ανάπτυξη του ενδοσπερμίου διαδραματίζει ρόλο στη παραμονή ή αποκοπή του καρπού.

Η αύξηση των καρπών ακολουθεί διπλή σιγμοειδή καμπύλη, ως τυπική δρύπη. Στο τέλος της περιόδου αποκοπής το μέγεθος του καρπού ανέρχεται στο 20-25% του τελικού μεγέθους. Η ωρίμανση αρχίζει στα μέσα Οκτωβρίου, όταν το χρώμα του καρπού αρχίζει να αλλάζει και διαρκεί ως τα μέσα Νοεμβρίου ή Ιανουαρίου, ανάλογα με την ποικιλία. Η μέγιστη περιεκτικότητα σε λάδι επιτυγχάνεται πριν την ωρίμανση του καρπού.

Από την καρπόδεση μέχρι την ωρίμανση μεσολαβούν 6-7 μήνες και ο καρπός περνάει από τρεις διαδοχικές φάσεις ανάπτυξης.

- i. Μια φάση ταχείας αύξησης του βάρους του τους δύο πρώτους μήνες (Ιούνιος, Ιούλιος) κατά την οποία αναπτύσσεται κυρίως ο πυρήνας και ελάχιστα η σάρκα.
- ii. Μια φάση βραδύτερης αύξησης το επόμενο δίμηνο (Αύγουστος, Σεπτέμβριος) κατά την οποία αναπτύσσεται η σάρκα και παρατηρείται σκλήρυνση του πυρήνα.
- iii. Μια φάση πάλι ταχείας αύξησης του βάρους του καρπού από τον Οκτώβριο και μετά, μέχρι να αρχίσει ο καρπός να αλλάζει χρώμα από πράσινο σε ιώδες και μαύρο.

Η παραγωγή των καρπών ξεκινά από το 3^ο έτος αλλά η πλήρης απόδοση του δέντρου επιτυγχάνεται μεταξύ 11^{ου} και 12^{ου} έτους για ξηρά εδάφη και μεταξύ 7^{ου} και 8^{ου} έτους για αρδευόμενα (Θέριος,2005).

1.4 Καλλιέργεια της ελιάς

Η ελιά είναι ανθεκτική σε αντίξοες συνθήκες και καλλιεργείται σε ποικιλομορφία εδαφοκλιματικών συνθηκών. Είναι μετρίως ανθεκτική στα άλατα και η καλλιέργεια της εντοπίζεται ως επί τον πλείστο σε σχετικά φτωχά και ξηρά εδάφη που άλλα φυτά λόγω ξηρασίας δεν ευδοκιμούν. Οι Μεσογειακές κλιματικές συνθήκες είναι ιδανικές για την καλλιέργεια της ελιάς λόγω των συχνών βροχοπτώσεων και της θερμοκρασίας. Οι ελαιοκομικές περιοχές έχουν μέση ετήσια θερμοκρασία 15-20° C, ελάχιστη -4° C και μέγιστη 40° C. Η ελάχιστη θερμοκρασία δεν μπορεί να πέσει κάτω από -7° C, γιατί ζημιώνει τα δέντρα (Θέριος,2005).

2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ

A. Γενικά:

Στο περιβάλλον του σύγχρονου ανθρώπου η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ηλιακή ακτινοβολία, το στρες, το κάπνισμα και οι διάφορες τοξικές ουσίες που διαχέονται στο περιβάλλον ως προϊόντα της νέας τεχνολογίας αποτελούν μερικούς από τους σημαντικούς φορείς και δότες ηλεκτρισμένων σωματιδίων, των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Η έκθεση όμως σε πολλούς φορείς ελευθέρων ριζών αυξάνει την ανάγκη για άμεση εξουδετέρωση τους με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι απαιτήσεις για αντιοξειδωτική δράση (Madsen and Bertelsen, 1995). Κατά συνέπεια όλο και περισσότεροι άνθρωποι στρέφονται στην κατανάλωση τροφών γνωστών για την αντιοξειδωτική τους δράση όπως ενδείκνυται και η μεσογειακή διατροφή. Η μεσογειακή διατροφή συνίσταται κυρίως από την κατανάλωση ελαιοκομικών προϊόντων και αναμφισβήτητα φέρει επωφελής επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι αυτό το πρότυπο διατροφής συμβάλλει στη μείωση της εμφάνισης του καρκίνου και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Τα οφέλη αυτά οφείλονται στην παρουσία λιπαρών οξέων και δευτερευόντων συστατικών όπως είναι οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή, τα φωσφολιπίδια, τα τριτερπενικά οξέα και οι βιοφαινόλες (Goulas *et al.*, 2012).

Στα κύτταρα του οργανισμού κατά τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας είναι δυνατόν να δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Radical Oxygen Species) που περιλαμβάνουν παράγωγα του μοριακού οξυγόνου μετά τη μερική, μη πλήρη αναγωγή του όπως ιόντα οξυγόνου και υπεροξειδία τόσο ανόργανα όσο και οργανικά. Ο όρος ελεύθερη ρίζα αναφέρεται για κάθε άτομο ή μόριο που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Με εξαίρεση το μοριακό οξυγόνο, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια προσδίδουν στις ελεύθερες ρίζες έντονη χημική δραστηριότητα, καθώς αυτά αναζητούν άλλα ηλεκτρόνια για να συζευχθούν. Οι ROS μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή του DNA και των λιπιδίων, προβλήματα στη λειτουργία της μεμβράνης και της πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες δρουν ως εκκαθαριστές των ROS και των ελευθέρων ριζών, καθώς αντιδρώντας με αυτές τις εξουδετερώνουν και δεν τις επιτρέπουν να αντιδράσουν με βιομόρια, ώστε να προκληθούν ζημιές (Antolovich *et al.*, 2002; López-Revuelta *et al.*, 2006).

Τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικά προσφέρουν το ηλεκτρόνιο τους και έτσι συνδέονται με την ελλιπή χημική ένωση, δηλαδή της ένωσης που της λείπει ένα ηλεκτρόνιο, δημιουργώντας μια ολοκληρωμένη χημική αλυσίδα. Η κάθε μια από αυτές ενεργεί και εξουδετερώνει συγκεκριμένη

ομάδα ελεύθερων ριζών, ενισχύοντας τους ήδη υπάρχοντες μηχανισμούς εξουδετέρωσης του οργανισμού (Madsen & Bertelsen, 1995).

Ενώσεις γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση, όπως προαναφέρθηκε, είναι και οι πολυφαινόλες των οποίων η δράση αποδίδεται κυρίως στην ικανότητα τους να συμπλοκοποιούν τον ελεύθερο σίδηρο ή χαλκό, δηλαδή τα δύο στοιχεία που συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton στην οποία περάγεται η τοξική υδροξυλική ρίζα. Ταυτόχρονα οι πολυφαινόλες δρουν ως εκκαθαριστές των ROS αλλά και ως υποστρώματα των υπεροξειδασών, ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις εκκαθάρισης του H₂O₂. Οι πολυφαινόλες θεωρούνται ως φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες και σε αυτές ανήκουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις που παράγονται στη μεταβολική οδό των φαινυλοπροπανοειδών στα φυτικά κύτταρα (Διαμαντίδης, 2007).

Φαινολικές ενώσεις, πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου (C₆) με ένα ή περισσότερα υδροξύλια (Harborne, 1989). Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην άμυνα των φυτών έναντι μικροβίων, εντόμων και ζώων καθώς επίσης προστατεύουν και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον συμβάλλουν στις μηχανικές ιδιότητες της δομής του φυτού (π.χ. ελαστικότητα ιστού), στο χρώμα και στο άρωμα τους (Scalbert *et al.*, 2002). Οι βιοφαινόλες εντοπίζονται με διάφορες μορφές (γλυκοζίτες, πολυμερή κ.α.) σε όλα τα τμήματα των φυτών από τις ρίζες και τα στελέχη μέχρι τα φύλλα και τους καρπούς.

Ο όρος βιοφαινόλες αναφέρεται συνήθως σε ενώσεις που η βιοσύνθεσή τους ακολουθεί την οδό του οξικού οξέος, του σικιμικού οξέος ή του συνδυασμού αυτών των δύο βιοσυνθετικών οδών (Harborne, 1989). Από τις συγκεκριμένες ενώσεις τα φλαβονοειδή, αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία (αριθμεί γύρω στις 4.000 ενώσεις) που με τη σειρά τους κατατάσσονται σε υποκατηγορίες (Harborne, 1989). Ωστόσο υπάρχουν και βιοφαινόλες, των οποίων η βιοσύνθεση ακολουθεί συνδυασμό άλλων οδών. Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται οι τοκοφερόλες, τα φαινολικά διτερπένια (π.χ. καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη), οι γλυκοζίτες σεκοϊριδοειδών (π.χ. ελαιοευρωπαϊνή) που θεωρούνται τερπένια (Jensen *et al.*, 2002, Hofius and Sonnewald, 2003).

Η ελιά περιέχει έναν μεγάλο αριθμό φαινολικών ενώσεων όπου η ποσότητα και οι τύποι τους ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των φύλλων της ελιάς και των καρπών, αν και οι καρποί συσσωρεύουν κυρίως γλυκοσιδικές μορφές των φλαβονοειδών και σεκοϊριδοειδών που βρίσκονται σε όλα τα μέρη του καρπού (επικάρπιο, μεσοκάρπιο και περικάρπιο), και απλές φαινόλες που απαντώνται σε μικρότερο βαθμό (Damtoft *et al.*, 1993)

Τα ιριδοειδή και σεκοϊριδοειδή είναι ενώσεις γλυκοζυλιωμένες, που παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων, και θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις των αλκαλοειδών του ινδολίου. Στην οικογένεια των *Oleaceae*, τα σεκοϊριδοειδή συνήθως προέρχονται από ολεοσίδια, ένα συνδυασμό ελενολικού οξέος με ένα γλυκοζιτικό κατάλοιπο. (Soler-Rivas *et al.*, 2000).

Τα σεκοϊριδοειδή δεν είναι διαλυτά στο λάδι με αποτέλεσμα μετά την μηχανική εκχύλιση, μόνο ένα μικρό τμήμα αυτών ανακτάται στο έλαιο, αντιπροσωπεύοντας τα πιο σημαντικά μικροσυστατικά του παρθένου ελαιολάδου που συμβάλλουν στην υγεία και στην ποιότητα του ελαίου που σχετίζεται με την γεύση και την οξειδωτική σταθερότητα (Servili and Montedoro 2002; Servili *et al.*, 2004)

Το πιο σημαντικό σεκοϊριδοειδές στην ελιά είναι η ελευρωπαϊνή και η συγκέντρωσή της μπορεί να τροποποιηθεί εξαιτίας ποικίλων παραγόντων που ρυθμίζουν την βιοσύνθεση και τον καταβολισμό της. Έχει δημοσιευθεί ένας σημαντικός αριθμός μελετών σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση της ελευρωπαϊνή και των παράγωγων ενώσεων της καθώς επίσης και για τις αντιμικροβιακές, αντικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους.

2.1 Σύνθεση συστατικών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες στα διάφορα μέρη της ελιάς

2.1.1 Ελαιόκαρπος

Η σύνθεση του ελαιοκάρπου περιλαμβάνει νερό (50%), πρωτεΐνες (1,6%), έλαιο (22%), υδατάνθρακες (19,1%), κυτταρίνη (5,8%), ανόργανες ουσίες (1,5%) και φαινολικές ενώσεις (1-3%). Άλλες σημαντικές ενώσεις που βρίσκονται στον καρπό της ελιάς είναι η πηκτίνη, τα οργανικά οξέα και οι χρωστικές ουσίες (Boskou, 1996).

Η κατανομή και η δομή των χημικών συστατικών του ελαιόκαρπου είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από την ποικιλία, την γεωγραφική προέλευση, τις καλλιεργητικές τεχνικές και το στάδιο ωρίμανσης.

Στον ελαιόκαρπο τα κύρια φαινολικά συστατικά που απαντώνται είναι τα εξής (Tsimidou *et al.*, 1992) :

➤ Ελευρωπαϊνή (oleuropein), εστέρας του ελενολικού οξέος με την υδροξυτυροσόλη. Η ελευρωπαϊνή έχει βρεθεί σ' ολόκληρο το δέντρο (Le Tutour and Guedon, 1992), συμπεριλαμβανομένων και όλων των συστατικών μερών του καρπού (φλοιός, σάρκα και σπέρματα), αλλά εμφανίζεται σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση στα φύλλα της ελιάς.

- Απομεθυλο-ελαιοευρωπαϊνή (demethyl oleuropein), οξικό παράγωγο της ελαιοευρωπαϊνής.
- Λιγστροσίδιο (ligstroside), εστέρας του ελενολικού οξέος με την τυροσόλη.
- Βερμπασκοσίδιο (verbascoside), εστέρας του καφεϊκού οξέος με την υδροξυτυροσόλη.

Ελευρωπαϊνή: Αποτελεί την πιο χαρακτηριστική ένωση της ομάδας των σεκοιριδοειδών και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για πολλές δεκαετίες εξαιτίας του γεγονότος ότι η παρουσία της συνδέεται με το στάδιο ωρίμανσης, την πικρή γεύση του καρπού και η συγκέντρωση της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία. (Amiot *et al.*, 1986; 1989) Πρόκειται για ένα γλυκοζίτη της β-3,4-διυδροξυφαινυλο αιθανόλης (υδροξυτυροσόλη) που εντοπίζεται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών. Όταν για κάποιο λόγο οι ιστοί υποστούν βλάβη, η ένωση υδρολύεται προς σχηματισμό της άγλυκης που στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τις φυτικές πρωτεΐνες καθιστώντας μη δυνατή την πέψη τους (Jensen *et al.*, 2002). Η παρουσία της συγκεκριμένης ένωσης διαπιστώθηκε να υπάρχει τόσο στους καρπούς όσο και στα φύλλα του ελαιόδεντρου (*Olea europaea*) στις αρχές του 20ου αιώνα.

Κατά την ωρίμανση του καρπού, πιθανώς, λόγω της δράσης ενζύμων (εστεράσες, β-γλυκοσιδάση), την κατεργασία του ελαιόκαρπου ή ακόμα και κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου η συγκεκριμένη ένωση είναι δυνατό να υποστεί αλλαγές στη δομή της και να δώσει μεγάλο αριθμό παραγώγων (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Έτσι, για παράδειγμα, κατά την ωρίμανση της ελιάς η ελευρωπαϊνή μετατρέπεται σταδιακά στην απομεθυλοελαιοευρωπαϊνή. Άλλες αλλαγές που συμβαίνουν στη δομή της είναι και η υδρόλυση του γλυκοζίτη προς σχηματισμό της αγλυκόνης και ισομερών της ενώσεων (Montedoro *et al.*, 1993). Επιπλέον, είναι δυνατή η διάνοιξη του δακτυλίου του ελενολικού οξέος, η αποκαρβοξυλίωση ή τελικά ο σχηματισμός μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεων όπως η υδροξυτυροσόλη και ο οξικός της εστέρας (Brenes *et al.*, 1999).

Η ένωση λιγστροσίδιο απαντάται κυρίως στους ανώριμους πράσινους καρπούς και η συγκέντρωση της μειώνεται κατά την ωρίμανση των καρπών (Bianchi, 2003) παρ' όλα αυτά ελάχιστη ποσότητα ανιχνεύεται και στους μαύρους καρπούς (Romero *et al.*, 2002a).

Η παρουσία της ένωσης verbascoside κυρίως στα φύλλα της ελιάς (ελάχιστη ποσότητα έχει ανιχνευθεί και στο ελαιόλαδο) και της ένωσης puzhenide στον σπόρο, επισημαίνεται στην πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών. Αντίθετα λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για

άλλες φαινολικές ενώσεις όπως φλαβόνες, φλαβονόλες ή άλλα συστατικά όπως ανθοκυανίνες στους μαύρους καρπούς (Tsimidou *et al.*, 1992).

Επικεντρώνοντας στην εξέλιξη των φαινολών κατά την ωρίμανση των ελαιοκάρπων και στον τρόπο με τον οποίο το περιεχόμενο σε φαινόλες συνδέεται με τον προσδιορισμό της εποχής συγκομιδής, οι περισσότερες δημοσιεύσεις συγκρίνουν την συγκέντρωση μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων μεταξύ πράσινων και μαύρων καρπών (Amiot *et al.*, 1986; Bianchi 2003; Bianco *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2005; Esti *et al.*, 1998; Gomez-Rico *et al.*, 2008; Jemai *et al.*, 2009; Morello *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2002a, b; Ryan *et al.*, 1999a, 2003) Διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης αυξάνεται από τους πράσινους στους μαύρους καρπούς κατά 30-40%, η συγκέντρωση της απομέθυλοελευρωπαΐνης αυξάνεται έως και 75%, της υδροξυτυροσόλης αυξάνεται κατά 20% κατά την ωρίμανση του καρπού ενώ της τυροσόλης διπλασιάζεται στους μαύρους καρπούς.

Οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των επιμέρους ενώσεων εξαρτώνται όχι μόνο από το στάδιο ωρίμανσης, η οποία διαρκεί αρκετούς μήνες αλλά επίσης από την ποικιλία, τη διαθεσιμότητα του νερού, την θερμοκρασία και τις καλλιεργητικές τεχνικές (Morello *et al.*, 2004) Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση της τυροσόλης είναι αυξημένη στα ελαιόδεντρα που έχουν υποστεί υδατική καταπόνηση (Gomez Rico *et al.*, 2006; Marsilio *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2002b)

Το φαινολικό ποιοτικό και ποσοτικό προφίλ διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών. Έχει βρεθεί, μάλιστα, ότι η απομέθυλοελευρωπαΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ποικιλιακός δείκτης, καθώς δεν απαντάται σε όλες τις ποικιλίες (Esti *et al.*, 1998). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι μικρόκαρπες ποικιλίες, όπως η Κορωνέικη, χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη και χαμηλή σε βερμπασκοσίδιο, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στις μεγαλόκαρπες ποικιλίες (Amiot *et al.*, 1986).

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.2) έχουν ταξινομηθεί σε πέντε ομάδες οι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στους καρπούς της ελιάς (Ghanbari *et al.*, 2012).

<u>Φαινολικές ενώσεις στον ελαιόκαρπο</u>	
<i>Flavonols</i>	Quercetin-3-rutinoside, Luteolin-7-glucoside, Luteolin-5-glucoside, Apigenin-7-glucoside
<i>Phenolic acids</i>	Chlorogenic acid, Caffeic acid, p-Hydroxybenzoic acid, Protocatechuic acid, Vanilic acid, Syringic acid, p- Coumaric acid, o-Coumaric acid, Ferulic acid, Sinapic acid, Benzoic acid, Cinnamic acid, Gallic acid
<i>Phenolic alcohols</i>	(3,4-Dihydroxyphenyl) ethanol (3,4-DHPEA), (p-Hydroxyphenyl) ethanol (p-HPEA)
<i>Secoiridoids</i>	Oleuropein, Demethyloleuropein, Ligstroside, Nuzhenide
<i>Hydroxycinnamic acid derivatives</i>	Verbascoside

Πιν. 2: Οι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στους καρπούς της ελιάς καταναμημένες σε πέντε ομάδες (Ghanbari *et al.*, 2012).

2.1.2 Ελαιόλαδο

Η παρουσία των βιοφαινολών στο ελαιόλαδο, εκτός από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που του προσδίδει, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις χημικές, οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες του παρθένου ελαιολάδου. Οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στο παρθένο ελαιόλαδο και ανήκουν στην κατηγορία των λεγόμενων πολικών συστατικών του ελαίου, εμποδίζουν την οξείδωση του, αποτελούν τη βάση της εξαιρετικής του θερμικής σταθερότητας και συνεισφέρουν επίσης στο χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση. Σε αντίθεση με τα άλλα φυτικά έλαια το παρθένο ελαιόλαδο λαμβάνεται με φυσική πίεση από όλον τον καρπό και για αυτό διατηρούνται οι φαινολικές του ουσίες. Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο δεν περιέχει φαινόλες, επειδή αυτές ως πολικά συστατικά, παρασύρονται σχεδόν ολοκληρωτικά από τα υδατικά διαλύματα του εξευγενισμού.

Η σύνθεση των φαινολών είναι πολύπλοκη και η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του σταδίου ωρίμανσης, την ποικιλία, την εποχή, την συσκευασία, την αποθήκευση, τις κλιματολογικές συνθήκες και τον βαθμό της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του (Boskou *et al.*, 2005) Η περιεκτικότητα των φαινολών στο

μεθανολικό εκχύλισμα του ελαίου μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 900mg/ kg (Baldioli *et al.*, 1996). Οι κύριες κατηγορίες των φαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, οι υδροξύ-ισοκρομάνες, τα φλαβονοειδή, τα σεκοιριδοειδή και οι λιγνάνες. Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3) αναφέρονται τα φαινολικά που απαντώνται στο ελαιόλαδο (Ghanbari *et al.*, 2012).

<u>Φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο</u>	
<i>Simple phenolic acids and related compounds</i>	Syringic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, o-coumaric acid, gallic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, ferulic acid, p-hydroxybenzoic acid, cinnamic acid, benzoic acid
<i>Simple phenols</i>	(3,4-Dihydroxyphenyl) ethanol (3,4 DHPEA) hydroxytyrosol, hydroxytyrosol acetate, (p-hydroxyphenyl) ethanol (p-HPEA), tyrosol, tyrosol acetate, (3,4-dihydroxyphenyl)ethanol-glucoside, vanillin
<i>Complex oleuropein derivatives</i>	Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA), dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to p-HPEA (p-HPEA-EDA), oleuropein aglycon (3,4 DHPEA-EA), ligstroside aglycon, p-HPEA-derivative, dialdehydic form of oleuropein aglycon, dialdehydic form of ligstroside aglycon, elenolic acid (free and glycoside)
<i>Flavonoids</i>	Apigenin, luteolin
<i>Lignans</i>	(+)-1-Acetoxypinoresinol, (+)-pinoresinol
<i>Hydroxy-isocromans</i>	1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman, 1-(39-methoxy-49-hydroxy) phenyl-6, 7-dihydroxy- isochroman

Πιν. 3: Οι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στο ελαιόλαδο κατανεμημένες σε έξι ομάδες (Ghanbari *et al.*, 2012).

Τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, οι υδροξυ-ισοκρομάνες και τα φλαβονοειδή απαντώνται σε μικρές ποσότητες στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο ενώ αντίθετα τα σεκοιριδοειδή και οι λιγνάνες αποτελούν τα κύρια φαινολικά συστατικά του λαδιού (Bianco *et al.*, 2001; Montedoro and G.F. 1972). Το περιεχόμενο σε φαινολικά οξέα είναι συνήθως λιγότερο από 1mg/kg στο ελαιόλαδο (Bendini *et al.*, 2007).

Η ελευρωπαΐνη και το λιγστροσίδιο έχουν επίσης επισημανθεί ως οι ελάχιστες υδρόφιλες φαινόλες που απαντώνται στο ελαιόλαδο (Owen *et al.*, 2000; Rovellini and Cortesi 2002). Οι ενώσεις 3,4-διυδροξυφαινυλ-αιθανόλη (3,4- DHPEA) και p-υδροξυφαινυλ-αιθανόλη (p-HPEA) αποτελούν τις κύριες φαινολικές αλκοόλες του ελαιολάδου. Η συγκέντρωσή τους είναι συνήθως χαμηλή στο φρέσκο λάδι αλλά αυξάνεται κατά την διάρκεια αποθήκευσης του (Montedoro *et al.*, 1992), λόγω της υδρόλυσης των σεκοιριδοειδών που οδηγεί στην παραγωγή της υδροξυτυροσόλης (3,4- DHPEA) και της τυροσόλης (p-HPEA) (Brenes *et al.*, 2001).

2.1.3 Φύλλα ελιάς

Ιστορικά, τα φύλλα της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως θεραπεία για την αντιμετώπιση του πυρετού και άλλων ασθενειών όπως η ελονοσία (Gucci *et al.*, 1997; Fernandez-Escobar *et al.*, 1999; Ciafardini and Zullo, 2002) στις Ευρωπαϊκές και Μεσογειακές χώρες όπως η Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία, Τουρκία, Παλαιστίνη, Μαρόκο και Τυνησία. Σύμφωνα με μελέτες έχει δείχθει πως τα φύλλα της ελιάς περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές, αντι-υπερτασικές, αντι-φλεγμονώδεις, υπογλυκαιμικές και υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες (Karakaya, 2009). Επιπλέον ιδιότητες που φέρουν είναι η μείωση της πίεσης του αίματος, η αύξηση της ροής του αίματος στις αρτηρίες, η μείωση της αρρυθμίας και η πρόληψη των εντερικών σπασμών (Khayyal *et al.*, 2002; Zarzuelo 1991; Pereira *et al.*, 2007). Το εκχύλισμα από τα φύλλα της ελιάς φέρει ισχυρή μικροβιοκτόνο δράση έναντι βακτηρίων, μυκήτων και του μυκοπλάσματος (Lee O. and Lee B. 2010; Benavente-Garcia *et al.*, 2000; Briante *et al.* 2003; Skerget *et al.*, 2005)

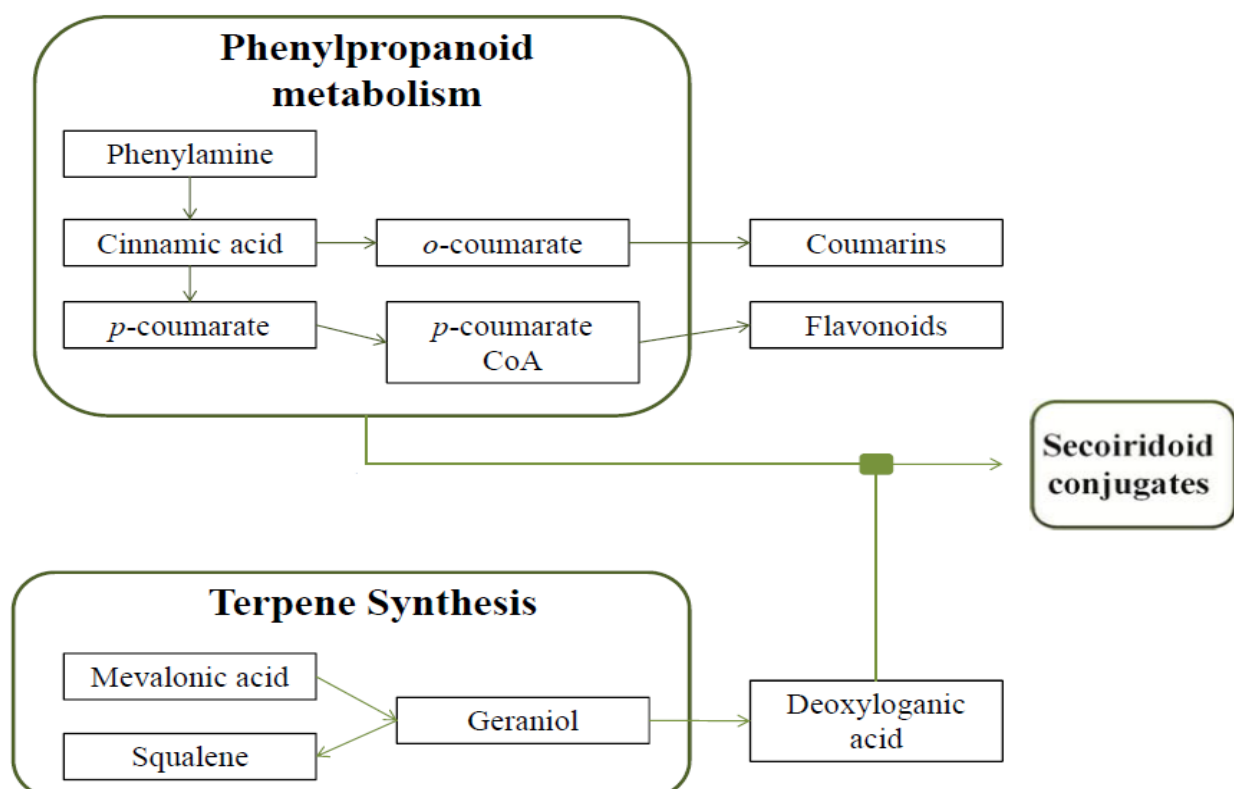
Τα παραπάνω οφέλη για την υγεία που προκύπτουν από την αξιοποίηση των φύλλων ελιάς σχετίζονται με την παρουσία μικρών μοριακού βάρους πολυφαινολών όπως είναι η ελευρωπαΐνη (εώς 60-90mg/g ξηρού βάρους φύλλων), υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, τοκοφερόλη, παράγωγα ελενολικού οξέος, καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ και βανιλικό οξύ καθώς και τα φλαβονοειδή: λουτεολίνη (luteolin), διοσμίνη (diosmetin), ρουτίνη (rutin), λουτεολίνη-7-γλυκοζίτης (luteolin-7-glucoside), απιγενίνη-7-γλυκοζίτης (apigenin-7-glucoside) και διοσμετίνη-7-γλυκοζίτης (diosmetin-7-glucoside) (Ryan *et al.*, 2003; Bianco and Uccella, 2000; Tasioula-Margari and Ologeri, 2001) .

Έχει επίσης βρεθεί πως οι συνδυασμένες φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με τις μεμονωμένες φαινόλες (Lee O. and Lee B., 2010).

Εξαιτίας των παραπάνω ιδιοτήτων και των πολύτιμων βιοφαινολικών συστατικών η χρήση ολόκληρου του φύλλου της ελιάς αλλά και του εκχυλίσματος έχει αξιοποιηθεί τόσο από φαρμακευτικές όσο και από βιομηχανίες τροφίμων (Fernandez-Escobar *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2007; Delgado-Pertinez *et al.*, 2000).

2.2 Βιοσύνθεση και καταβολισμός των βιοφαινολών της ελιάς

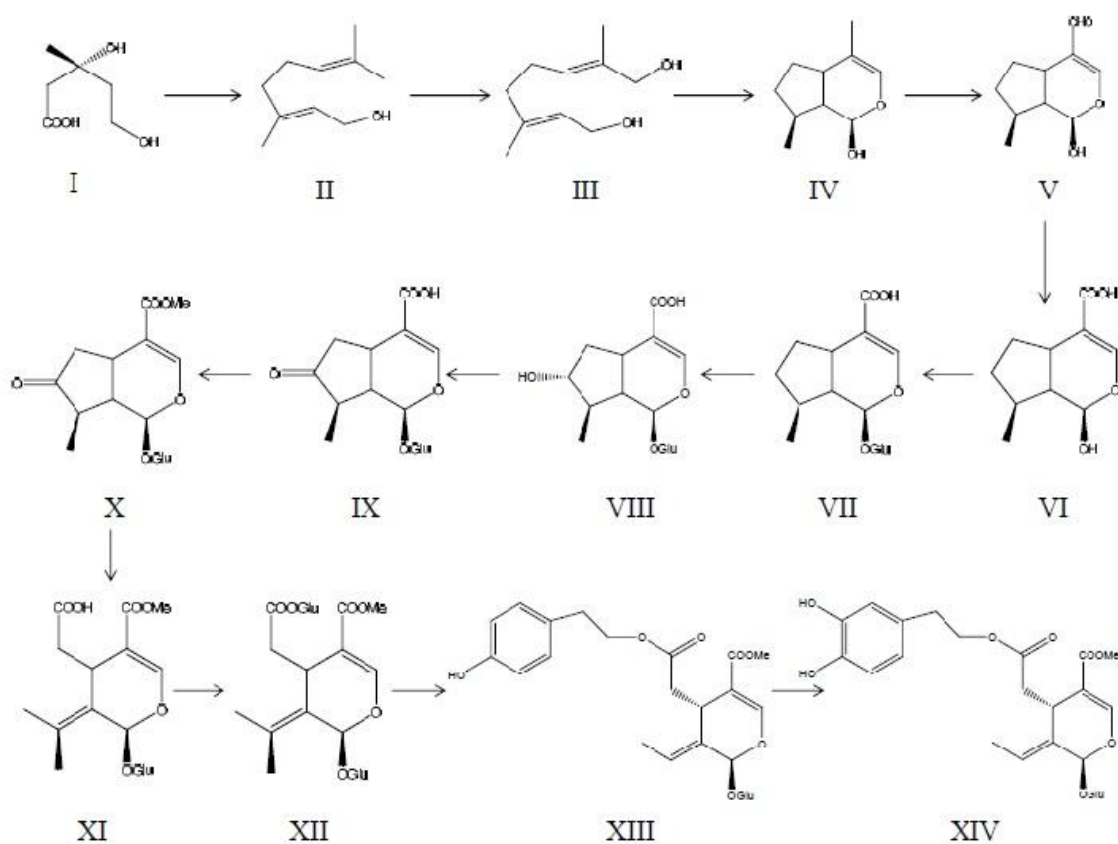
Η βιοσύνθεση των σεκοιριδοειδών (ελευρωπαΐνη και τα παράγωγα της) στην ελιά πραγματοποιείται μέσω μιας διακλάδωσης στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος στο οποίο συνδυάζονται η σύνθεση των τερπενίων και ο μεταβολισμός των φαινυλοπροπανοειδών (εικ.5). Ενώ η μεταβολική οδός των φαινυλοπροπανοειδών έχει διαλευκανθεί, η βιοσυνθετική οδός των σεκοιριδοειδών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως μέχρι σήμερα, παρόλα αυτά έχει προταθεί ένα μονοπάτι για ορισμένα είδη Oleaceae (Obied *et al.*, 2008; Damtoft *et al.*, 1995; Damtoft *et al.*, 1995).



Εικ.5: Ο συνδυασμός της μεταβολικής οδού των φαινυλοπροπανοειδών με του μεβαλονικού οξέος για τον σχηματισμό των παραγώγων των σεκοιριδοειδών.

Τα σεκοιριδοειδή προέρχονται από ολεοζίντες. Η συσσώρευση των σεκοιριδοειδών είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία κατά την οποία η έκφραση και η σύνθεση τους ποικίλουν μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών, των ιστών, του αναπτυξιακού σταδίου και των διαφορετικών αποκρίσεων σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Malik and Bradford, 2008).

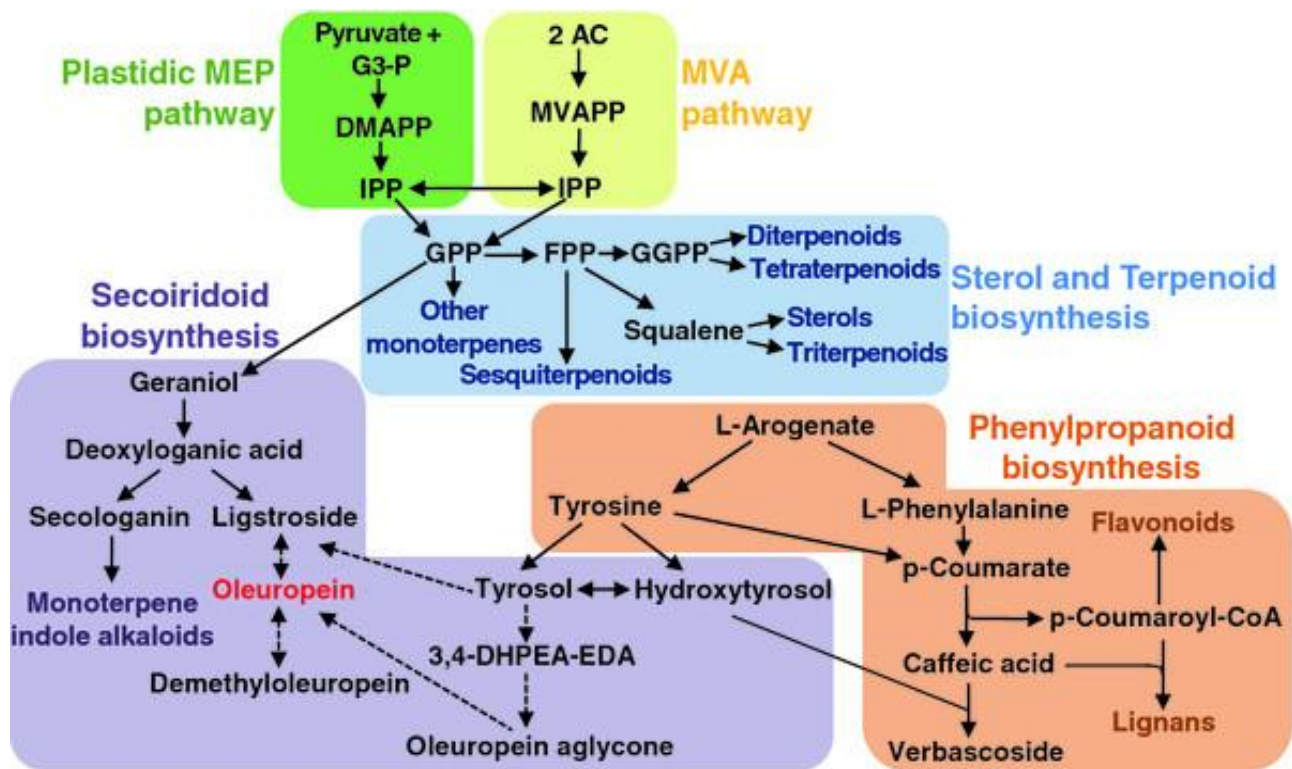
Η προτεινόμενη βιοσυνθετική οδός της ελαιοευρωπαϊνης σύμφωνα με τους Obied *et al.* (2008) παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικ 6. Προτεινόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ελαιοευρωπαϊνης (Obied *et al.*,2008). (I) mevalonic acid, (II) geraniol, (III) 10-hydroxygeraniol, (IV) iridoidal, (V) iridotrial, (VI) deoxyloganic acid glycone, (VII) deoxyloganic acid, (VIII) 7-*epi*-loganic acid, (IX) 7-ketologanic acid, (X) 7-ketologanin, (XI) oleoside 11-methyl ester, (XII) 7-1-D-glucopyranosyl 11-methyl oleoside, (XIII) ligstroside, and (XIV) oleuropein.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, ο σκελετός άνθρακα των σεκοιριδοειδών παρέχεται από το μεβαλονικό οξύ. Η γερανιόλη, η 10-υδροξυγερανιόλη, η 10-υδροξυνερόλη και τα ιριδοειδή αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της λογγανίνης (loganin). Το μονοπάτι αυτό δείχνει πως το δεοξυ-λογγανικό οξύ, το 7-επι-λογγανικό οξύ, το 7-κετολογγανικό οξύ και η 7-κετολογγανίνη είναι οι τελευταίες πρόδρομες, ιριδοειδείς ενώσεις που οδηγούν στη σύνθεση του λιγστροσιδίου και τελικά στη σύνθεση της ελευρωπαΐνης (Gutierrez-Rosales *et al.*, 2010; Damtoft *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 2002).

Σε πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη (Alagna *et al.*, 2012), από την βάση δεδομένων της ελιάς (Olea fruit EST database) επιλέχθηκαν 27 μεταγραφήματα με κριτήριο την πιθανή συμμετοχή τους στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών της ελιάς (σεκοιριδοειδή, φαινολικά, τερπένια και στερόλες) (Morello *et al.*, 2004). Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των σεκοιριδοειδών δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί εξαιτίας του γεγονότος ότι συντίθενται μόνο σε ένα περιορισμένο αριθμό ειδών των οποίων οι ακολουθίες των γονιδιωμάτων τους δεν έχουν ακόμη καταγραφεί. Είναι πιθανό να προβλεφθούν κάποιες από τις ενζυμικές λειτουργίες παρατηρώντας παρόμοια βιοσυνθετικά μονοπάτια καλά χαρακτηρισμένων φυτικών ειδών, όπως το μονοπάτι βιοσύνθεσης ινδολαλκαλοειδών στο *Catharanthus roseus* (Collu *et al.*, 2001; Irmiler *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2008) Στην εικόνα που ακολουθεί γίνεται αναπαράσταση της πιθανής βιοσυνθετικής οδού των κύριων δευτερογενών ενώσεων της ελιάς και φαίνεται πως η βιοσύνθεση των σεκοιριδοειδών συνδέεται με τα μονοπάτια βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών, στερολών και τερπενοειδών (Alagna *et al.*, 2012).



Εικ.7:Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών βιοσυνθετικών μονοπατιών των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών της ελιάς. *MEP pathway*: plastidial 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate, *MVA pathway*: cytosolic mevalonate, *GPP*: Geranyl diphosphate. Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν βιοσυνθετικά στάδια που δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

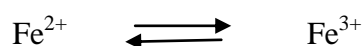
Τα πρώτα δεδομένα σε επίπεδο τρανσκριπτόματος για την ελιά δημοσιεύθηκαν πρόσφατα καθιστώντας μια σημαντική πηγή για την ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του φυτού (Alagna *et al.*, 2009; Galla *et al.*, 2009). Ο καταβολισμός της ελευρωπαΐνη πραγματοποιείται κατά την ωρίμανση, την αποθήκευση και την επεξεργασία των ελαιοκάρπων (Gutierrez-Rosales *et al.*, 2010; Piperno *et al.*, 2004). Η αποικοδόμηση των ολεοζιτικών σεκοιριδοειδών μπορεί να συμβεί είτε ενζυμικά είτε χημικά (Jemai *et al.*, 2009). Έχει επίσης βρεθεί πως ο καταβολισμός της ελευρωπαΐνη σε ελενολικό οξύ ή απομέθυλοευρωπαΐνη πραγματοποιείται μέσω της καταλυτικής δράσης των εστερασών στους ώριμους καρπούς (Riachy *et al.*, 2011). Επιπλέον πιθανός είναι και ο σχηματισμός της αγλυκόνης ελαιοευρωπαΐνης από τις β-γλυκοσιδάσες κατά την σύνθλιψη των καρπών και τις διαδικασίες μάλαξης. Ο Obied και οι συνεργάτες του, αναφέρουν την πιθανή μετατροπή των ολεοζιτών κατά την ωρίμανση, την μεταποίηση και τον χειρισμό των καρπών που καταλήγει στον σχηματισμό 25 παράγωγων ενώσεων της ελευρωπαΐνης (Obied *et al.*, 2008). Τέλος, έχει περιγραφεί η δράση της υπεροξειδάσης (POD) και της

πολυφαινολοξειδάσης (PPO) στις οξειδωτικές αντιδράσεις των παράγωγων ενώσεων των σκεοιριδοειδών καθώς τα ένζυμα αυτά οξειδώνουν μονοφαινόλες και ο- διφαινόλες (Ortega-Garcia and Peragon,2009).

3. ΧΡΩΜΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ: ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΑ

Οι χρωμοπρωτείνες είναι σύμπλοκες πρωτείνες και, όπως υποδηλώνει και το όνομα τους, είναι έγχρωμες γιατί απορροφούν ορισμένα μήκη κύματος της ζώνης του ορατού φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η απορρόφηση του φωτός οφείλεται στη προσθετική τους ομάδα, δηλαδή στο μη πρωτεϊνικό τμήμα του μορίου τους, που είναι δυνατό να είναι: ένα μέλος των πορφυρινών, όπως η αίμη (στην περίπτωση αυτή τα αντίστοιχα μόρια ονομάζονται *αιμοπρωτείνες*), ένα μεταλλικό ιόν (*μεταλλοπρωτείνες*) και ένα οργανικό μόριο, όπως το FAD ή το FMN που είναι παράγωγα της φλαβίνης (*φλαβινοπρωτείνες*).

Τα κυτοχρώματα αποτελούν μια μεγάλη ομάδα χρωμοπρωτεϊνών, η προσθετική ομάδα των οποίων είναι όμοια ή παρόμοια του μορίου αίμης των αιμοσφαιρινών. Η λειτουργία των κυτοχρωμάτων ως δότες και δέκτες ηλεκτρονίων (οξειδοαναγωγικοί καταλύτες) επιτυγχάνεται με τις αντιστρεπτές μεταβολές του αριθμού οξείδωσης του σιδήρου, που εναλλάσσεται μεταξύ της ανηγμένης δισθενούς μορφής Fe(II) και της οξειδωμένης τρισθενούς μορφής Fe(III):



Τα διάφορα κυτοχρώματα διαφέρουν μεταξύ τους είτε στο πρωτεϊνικό τους τμήμα ή στον τρόπο σύνδεσης της προσθετικής τους ομάδας με το πρωτεϊνικό τμήμα ή στους διάφορους υποκαταστάτες του πορφυρινικού δακτυλίου. Οι διαφορές αυτές οφείλονται κατά κύριο λόγο τόσο στα διαφορετικά τους φάσματα απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στη ζώνη του ορατού αλλά επίσης και στην αναγωγική τους ικανότητα (Διαμαντίδης,2007).

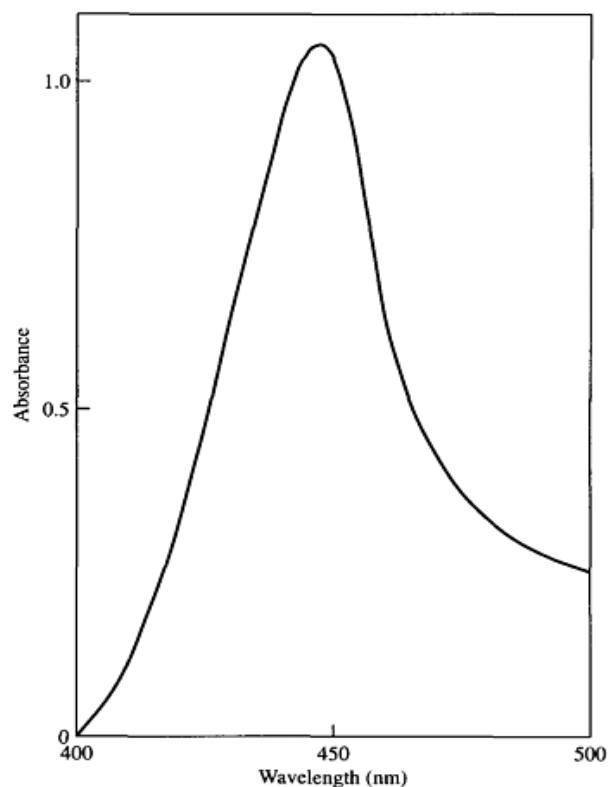
➤ Κατηγορίες κυτοχρωμάτων

Με βάση λοιπόν τα χαρακτηριστικά τους φάσματα και τη χημική τους δομή, τα κυτοχρώματα χωρίζονται σε τρεις κύριες ομάδες: την ομάδα *a*, την ομάδα *b* και την ομάδα *c*. Η προσθετική ομάδα της ομάδας *b* είναι η αίμη, όπως στην αιμοσφαιρίνη και στη μυοσφαιρίνη, η οποία συνδέεται με

ασθενείς ηλεκτροστατικούς δεσμούς με το πρωτεϊνικό τμήμα. Επίσης και στα κυτοχρώματα της ομάδας c η προσθετική ομάδα είναι η αίμη η οποία όμως συνδέεται με δύο ισχυρούς θειοαιθερικούς δεσμούς με το πρωτεϊνικό τμήμα. Καθένας από τους θειοαιθερικούς δεσμούς αναπτύσσεται μεταξύ μιας σουλφυδρυλικής ομάδας της κυστεΐνης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και μιας βινυλικής ομάδας της αίμης. Και τέλος η προσθετική ομάδα των κυτοχρωμάτων της α ομάδας είναι διαφορετική του μορίου της αίμης και ονομάζεται *αίμη α* ή *κυτοαιμίνη*. Μια μυρμηκική (-CHO) αντικαθιστά μια μεθυλική ομάδα και μια μεγάλη αλειφατική αλυσίδα ατόμων άνθρακα αντικαθιστά μια βινυλική ομάδα στον βασικό πορφυρινικό δακτύλιο. Κύρια μέλη της ομάδας είναι το *cyt a* και *cyt a3*. (Διαμαντίδης,2007).

3.1 Τα κυτοχρώματα P-450

Μια μεγάλη ομάδα κυτοχρωμάτων με έντονη παραλλακτικότητα αποτελούν **τα κυτοχρώματα P-450**. Ο όρος P450 προέρχεται από την μέγιστη οπτική τους απορρόφηση στα 450nm παρουσιάζοντας τη χαρακτηριστική κορυφή Soret (εικόνα 8), όταν το ένζυμο βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή και σε σύμπλοκο με το μονοξείδιο του άνθρακα (Denisov *et al.*, 2005). Αρχικά θεωρήθηκε ότι το P450 κυτόχρωμα πρόκειται για ένα και μοναδικό ένζυμο αλλά σύντομα έγινε σαφές ότι συγκαταλέγεται σε μια ομάδα ενζύμων, και το καθένα φέρει διαφορετική θέση σύνδεσης υποστρώματος και συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Lewis,2005)



Εικ. 8: Απορρόφηση της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 450nm που δείχνει την χαρακτηριστική κορυφή Soret.

Τα κυτοχρώματα P450 είναι γνωστά και ως μονοξυγονάσες αλλά πέραν της υδροξυλίωσης, τα ένζυμα αυτά καταλύουν ένα ευρύτατο φάσμα αντιδράσεων όπως αφαμίνωση, αφαλογόνωση, εποξειδωση, υπεροξειδωση, και αναγωγή. Καθώς όμως ο χαρακτηριστικός τρόπος δράσης των ενζύμων αυτών δεν είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων, αλλά η μεταφορά ατόμων οξυγόνου, σε συνδυασμό με την ύπαρξη ενός σουλφιδικού υποκατάστατη στην αίμη που είναι υπεύθυνος για τις ασυνήθιστες φασματικές ιδιότητες και καταλυτικές λειτουργίες αυτών των αιμοπρωτεϊνών, η ονομασία 'heme-thiolate proteins' προτάθηκε από την IUB Nomenclature Committee το 1989. Επομένως χαρακτηρίζονται ως αιμο-σουλφιδικά (heme-thiolate) ένζυμα με οξειδοαναγωγικές ιδιότητες (Lewis 2005). Το 'κυτόχρωμα P450' αποτελεί τη συλλογική ονομασία μιας πολυμελούς υπεροικογένειας πρωτεϊνών, τα μέλη της οποίας προήλθαν από ένα κοινό πρόγονο και διαφοροποιήθηκαν κατά την εξελικτική πορεία, ενώ είναι ευρύτατα διαδεδομένα σε διάφορες μορφές ζωής, από τα ζώα και τα φυτά, ως τους μύκητες και τα βακτήρια. Η τριτοταγής δομή των P450 εξελίχθηκε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έρθουν σε επαφή σημαντικά στοιχεία που απαιτούνται για τον καταλυτικό ρόλο των P450 δηλαδή περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος, αίμη, οξυγόνο και οξειδοαναγωγικοί εταίροι.

Έχει τεκμηριωθεί πως τα P450 λειτουργούν ως ευέλικτοι καταλύτες στις αντιδράσεις βιοσύνθεσης φυτικών ενώσεων, όπως ορμόνες, λιπαρά οξέα, στεροειδή και τερπενοειδή, και αποτελούν το κλειδί για την διαρθρωτική ποικιλομορφία και την εξειδίκευση αυτών των ενώσεων (Mizutani and Sato, 2011; Schuler, 2011). Το γεγονός ότι οι εξειδικευμένοι αυτοί μεταβολίτες (κυρίως τα τερπενοειδή) συμβάλλουν στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπων στρες και φέρουν ιδιότητες ευεργετικές για τον άνθρωπο, τις καθιστά ενώσεις υψηλού εμπορικού ενδιαφέροντος στην φαρμακευτική βιομηχανία και βιοτεχνολογική έρευνα (Mizutani,2012).

Τα φυτά περιέχουν το μεγαλύτερο αριθμό κυτοχρωμάτων P450 ανά γονιδίωμα. Το γονιδίωμα των ζώων περιλαμβάνει λιγότερα από 100 P450 ενώ τα ανώτερα φυτά περιέχουν περισσότερα από 250. Ο αριθμός αυτός στα φυτικά γονιδιώματα έχει αυξηθεί και συνεχίζει να αυξάνεται ολοένα και περισσότερο και σε αυτό έχει συμβάλλει η τεχνολογική εξέλιξη στην αλληλούχιση των γονιδιωμάτων σε συνδυασμό με την μείωση του κόστους. Κατά συνέπεια από την στιγμή που αυξάνεται ο αριθμός των φυτικών γονιδιωμάτων που αλληλουχείται, νέες οικογένειες φυτικών P450 έχουν ανακαλυφθεί και υπολογίζονται στις 127 (Hamberger and Bak,2013). Περισσότερες από 5000αλληλουχίσεις έχουν κατοχυρωθεί στην βάση δεδομένων των φυτών (Nelson and Werck-Reichhart ,2011). Συγκεκριμένα έχουν καταγραφεί τα εξής δεδομένα όσο αφορά τον αριθμό των γνωστών P450 γονιδίων, και είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στο κάθε φυτικό είδος ο αριθμός των

P450 γονιδίων αντιπροσωπεύει μέχρι και το 1% του συνολικού γονιδιώματος (Nelson *et al.*, 2004; 2008).

- ✓ *Arabidopsis thaliana*: 245
- ✓ Σταφύλι : 316 (*Vitis vinifera*)
- ✓ Σόγια : 332 (*Glycine max*)
- ✓ Λεύκα : 312 (*Populus trichocarpa*)
- ✓ Ρύζι : 334 (*Oryza sativa*)
- ✓ Σόργο : 372 (*Sorghum bicolor*)

Οι αναλύσεις σε επίπεδο τρανσκριπτόματος συμβάλλουν στην αύξηση ταυτοποίησης των P450 ακολουθιών από διάφορα είδη φυτών. Όμως οι λειτουργίες των περισσότερων από αυτών είναι ακόμα άγνωστες, για παράδειγμα στο *Arabidopsis thaliana* ο αριθμός των λειτουργικά χαρακτηρισμένων γονιδίων P450 είναι 60, το οποίο συνεπάγεται ότι περισσότερο του 70% των 245 γονιδίων χρειάζεται να χαρακτηριστούν (Mizutani and Ohta, 2010).

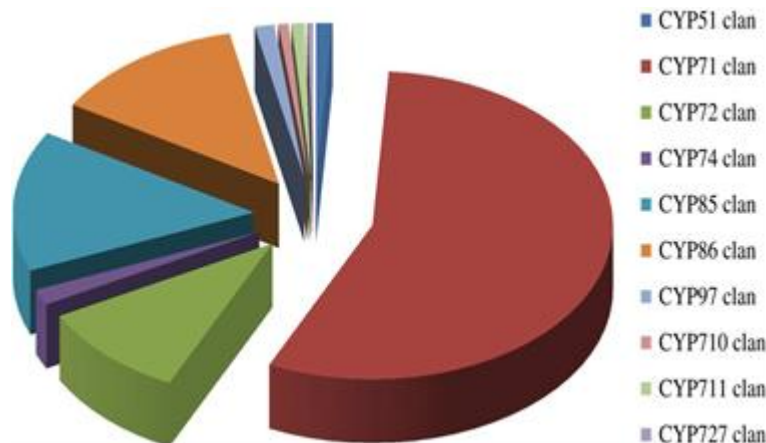
3.1.1 Ονοματολογία

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των P450 είχε προκαλέσει σύγχυση στην ονομασία τους κατά τη δεκαετία του '80, οπότε και επικράτησε η συστηματική κατάταξή τους σε οικογένειες και υποοικογένειες, με σειριακούς αριθμούς, βάσει του βαθμού ομοιότητάς τους σε επίπεδο ακολουθίας. Η σύντμηση CYP δηλώνει ένα κυτόχρωμα P450 και ακολουθείται από έναν αριθμό που ονομάζει την οικογένεια. Τα κυτοχρώματα ανήκουν στην ίδια οικογένεια αν έχουν πάνω από 40% ομολογία σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας. Τον αριθμό ακολουθεί ένα κεφαλαίο γράμμα που συμβολίζει την υποοικογένεια, στην οποία εντάσσονται δύο μέλη αν έχουν πάνω από 55% ομολογία. Κάθε μεμονωμένο μέλος παίρνει ακολούθως, αυθαίρετα έναν αριθμό, πχ. το CYP1A1 αποτελεί ένα κυτόχρωμα που ανήκει στην υποοικογένεια A της οικογένειας 1 και είναι το πρώτο μέλος της. Η ονοματολογία για τα γονίδια είναι ίδια με των πρωτεϊνών, μόνο που χρησιμοποιούνται italics, πχ. *CYP1A1*. Αυτός ο τρόπος κατάταξης έχει επικρατήσει, μαζί με το συμβατικό όνομα κάθε ενζύμου, βάσει της φυσιολογικής του λειτουργίας.



Τα κυτοχρώματα P450 στα ανώτερα φυτά εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, όπως λιγνίνες, φλαβονοειδή, τερπένια, αλκαλοειδή, φυτοαλεξίνες, ενώ έχει μελετηθεί και η συμβολή τους στη σύνθεση ρυθμιστών αύξησης, όπως οι γιββερελλίνες, το αμπισσικό οξύ και τα μπρασσινοστεροειδή. Το θέμα είναι ότι τα φυτικά γονίδια των CYP 450 παρουσιάζουν εντονότερη παραλλακτικότητα, συγκριτικά με τους άλλους ευκαρυώτες, πράγμα που πιθανότατα σχετίζεται με την εμπλοκή τους στην βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, η ποικιλία των οποίων στα φυτά είναι τεράστια. Αυτή η χημική ποικιλότητα των δευτερογενών μεταβολιτών, αντανακλάται από τη διαφορετικότητα των κυτοχρωμάτων σε επίπεδο νουκλεοτιδικής και αμινοξικής ακολουθίας

Τα P450 των ανώτερων φυτών κατηγοριοποιούνται στις εξής οικογένειες: **CYP 51, 71-99, 701-727, 736.** (Hamberger and Søren, 2013)

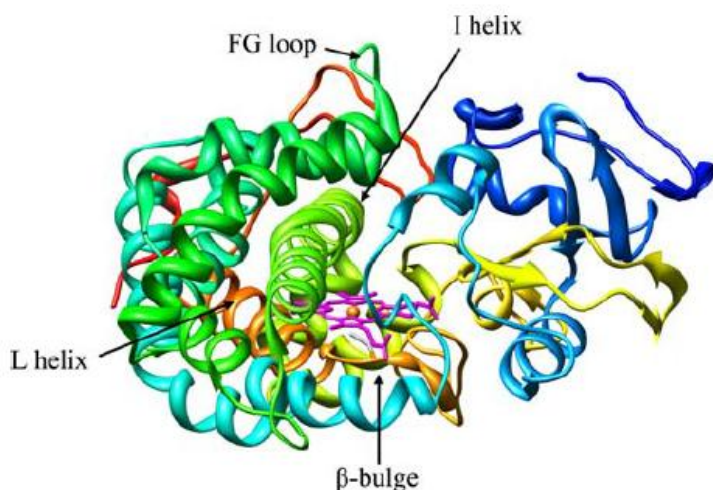


Εικ.9: Σχετική κατανομή των P450 στα αγγειόσπερμα. Ο μέσος αριθμός που καταγράφηκε (David Nelson) βασίζεται στα γονιδιώματα των *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis*, *Jatropha curcas*, *Glycine max*, *Oryza sativa* και *Brachypodium distachyon*.

Οι πιο συχνές αντιδράσεις που καταλύουν στα φυτά είναι κυρίως οι υδροξυλιώσεις, αλλά και εποξειδώσεις, οξειδωτικές αλκυλιώσεις ή φαινολικές συζεύξεις. Το πρώτο κυτόχρωμα P 450 που βρέθηκε στα φυτά ήταν το CYP 71A1 από το *Persea americana* (αβοκάντο), (Bozak *et al.*, 1990). Από κει και πέρα άρχισαν και οι έρευνες σχετικά με το ρόλο των ενζύμων αυτών στις διάφορες βιοχημικές διεργασίες όπως η βιοσύνθεση φλαβονοειδών, κυανογόνων γλυκοσιδίων, η σύνθεση αλκαλοειδών, τερπενίων, η από-μεθυλίωση στεροειδών, υδροξυλίωση των μπρασσινοστεροειδών, η βιοσύνθεση του DIMBOA (Frey *et al.*, 1997) και η υδροξυλίωση λιπαρών οξέων (Omura 1999).

3.1.2 Η μοριακή δομή των κυτοχρωμάτων P450

Από τις γνωστές κρυσταλλικές δομές όλων των ειδών, η δευτεροταγής δομή των P450 αποτελείται από 12 περίπου α-έλικες εκ των οποίων οι έλικες I και L μεταξύ των οποίων εντοπίζεται η αίμη. Ο 5ος υποκαταστάτης της αίμης, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη χαρακτηριστική απορρόφηση στα 450 nm του CO της ανηγμένης μορφής της αιμοπρωτεΐνης, είναι ένα αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνης συνδεδεμένο με τον σίδηρο της αίμης. Ο αιμο-σουλφιδικός συνδέτης (thiolate-heme ligand) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της διάσπασης του δεσμού O-O (Sono *et al.*, 1996). Εξαιτίας της μοναδικής χημείας Fe-S, ο σουλφιδικός συνδέτης βρίσκεται σε μια συντηρημένη περιοχή που αναφέρεται ως β-αναδίπλωση (β-bulge) και φέρει την αλληλουχία υπογραφή όλων των P450 κυτοχρωμάτων F-XX-G-K(R)-XX-C-X-G. (Hamdane *et al.*, 2008)



Εικ. 10: Η δευτεροταγής δομή των P450 κυτοχρωμάτων. Η μπλε έλικα αναπαριστά το N-τελικό άκρο ενώ η κόκκινη το C-τελικό άκρο. Η αίμη αναπαριστάται με μωβ χρώμα.

➤ Κατηγορίες

Τα κυτοχρώματα P450 μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες με βάση τους συμπαραγόντες που συμμετέχουν στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (Hamdane *et al.*, 2008) :

- *Κατηγορία I:* Απαντούν σε βακτήρια και στις μιτοχονδριακές μεμβράνες των ευκαρυωτικών οργανισμών και λαμβάνουν ηλεκτρόνια από την φερεδοξίνη, μια πρωτεΐνη που περιέχει ως προσθετική ομάδα ένα σιδηροθειούχο κέντρο (FeS πρωτεΐνες).
- *Κατηγορία II:* Βρίσκονται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου των ευκαρυωτών. Λαμβάνουν ηλεκτρόνια απευθείας από την NADPH- εξαρτώμενη αναγωγή P450 (CPR), μια φλαβινοπρωτεΐνη στην οποία είναι συνδεδεμένα νουκλεοτίδια φλαβίνης (FAD και FMN) και λειτουργούν ως συμπαραγόντες οξειδοαναγωγής.

- *Κατηγορία III:* Οι πρωτεΐνες P450 αυτής της κατηγορίας δεν χρειάζονται κάποιον συμπαράγοντα οξειδοαναγωγής καθώς τα γονίδια των P450 και της CPR είναι συντηγμένα σε ένα ενιαίο πολυπεπτίδιο.
- *Κατηγορία IV:* Τα μέλη αυτής της ομάδας δέχονται ηλεκτρόνια απευθείας από το NADPH.

➤ Συντηρημένες ακολουθίες- μοτίβα

Υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές ακολουθίες-μοτίβα που παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό συντήρησης μεταξύ μεγάλου αριθμού οικογενειών κυτοχρωμάτων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, λόγω της συμβολής τους σε βασικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αυτών. Οι σημαντικότερες είναι:

1. Η χαρακτηριστική υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης του αμινοτελικού άκρου.

2. Το πλούσιο σε προλίνες τετραπεπτίδιο, στην αμινοτελική περιοχή του μορίου, που επίσης συμβάλει στην στόχευση και πρόσδεση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στις μεμβράνες.

3. **Domain A:** Αντιστοιχεί στην έλικα I, η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στις καταλυτικές δράσεις των ενζύμων αυτών, περιλαμβάνοντας αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στη μεταφορά πρωτονίων και την πρόσδεση των οξυγόνων. Περιλαμβάνει την υψηλά συντηρημένη ακολουθία A/GGxD/ETx μεταξύ των φυτικών P450, η οποία αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα. Η ακολουθία αυτή περιλαμβάνει μια άκρως συντηρημένη αλανίνη και γλυκίνη στο N-τελικό άκρο, ενώ το C-τελικό άκρο περιέχει συνήθως μια θρεονίνη που προηγείται από ένα όξινο κατάλοιπο. Πιστεύεται πως το κατάλοιπο γλυκίνης στη θέση αυτή ευθύνεται για την ασυνήθιστη παραμόρφωση στην έλικα η οποία επιτρέπει την πρόσδεση ενός μορίου οξυγόνου στο σίδηρο της αίμης. Το κατάλοιπο θρεονίνης φαίνεται να είναι απαραίτητο για να εξασφαλιστεί μια αντίδραση μονοοξυγόνωσης των υποστρωμάτων από τα P450, καθώς η μετάλλαξη του τείνει να προκαλέσει απόζευξη της αντίδρασης.

4. **Domain B:** Αντιστοιχεί στην έλικα K που περιέχει το συντηρημένο μοτίβο Glu-X-X-Arg και πιθανώς σταθεροποιεί τη δομή του πυρήνα.

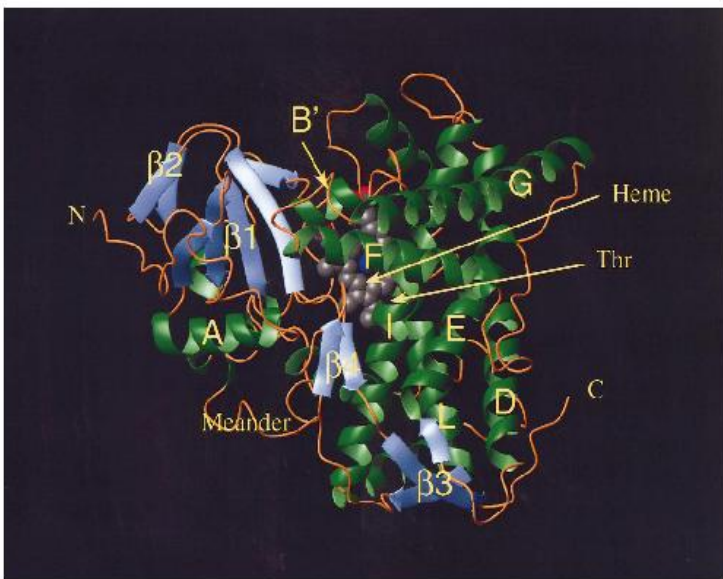
5. Domain D ή heme-binding domain: Αντιστοιχεί στην έλικα L και περιέχει το κατάλοιπο της κυστεΐνης(Cys 448), που αποτελεί τον σύνδεσμο με την αίμη. Περιλαμβάνει την ακολουθία-αποτύπωμα της κλάσης των CYP 450 ενζύμων *Phe-XX-Gly-Xb-XX-Cys-X-Gly*. Εκτός από τα μη-συντηρημένα κατάλοιπα, το μοτίβο αυτό περιλαμβάνει το υδρόφοβο αρωματικό κατάλοιπο φαινυλαλανίνης, την αμετάβλητη υδρόφοβη κυστεΐνη και το αμινοξύ γλυκίνη. Μεταξύ αυτών απαντάται ένα βασικό αμινοξύ (Xb) το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με την αναγωγή. Ο σίδηρος της αίμης εμπλέκεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα κύτταρα μέσω των κυκλικών οξειδώσεων και των αναγωγικών αντιδράσεων. (Lewis, 2005)

Οι περιοχές A και D σχηματίζουν την θήκη που περιβάλλει την αίμη και τα διάφορα υποστρώματα.

<i>Function of P450</i>	<i>Structural features involved</i>
1. Binding of heme	I and L helices, invariant cysteine and usually two basic amino acid residues for ion-pairing with heme propionates
2.Binding and activation of oxygen	I Helix region distal to the heme moiety
3.Binding redox partners	Basic amino acid residues for ion-pairing
4.Enabling proton transfer to oxygen	Internal ion-pairs within the heme environment
5.Binding different substrates	B', F and I helices, β , and β_4 sheets (SRS regions) <i>SRS=Substrate recognition site (Gotoh, 1992)</i>
6.Regulating these activities within a membrane	N-terminal peptide of 30–40 residues in length

Πιν.4: Διαρθρωτικές λειτουργίες των ενζύμων P450 (Lewis, 2005)

Το πρώτο P450 που απομονώθηκε και κρυσταλλώθηκε ήταν ένα υδατοδιαλυτό βακτηριακό P450, το P450cam του *Pseudomonas putida*. Μετά τη διαλεύκανση της **τεταρτοταγούς δομής** του μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με ακτίνες X (Poulos *et al.*, 1986), βρέθηκε ότι το γενικότερο σχήμα του P450cam είναι ένα ασύμμετρο τριγωνικό πρίσμα, αποτελούμενο από 12 α -έλικες και 5 αντιπαράλληλες β επιφάνειες (εικόνα 11).

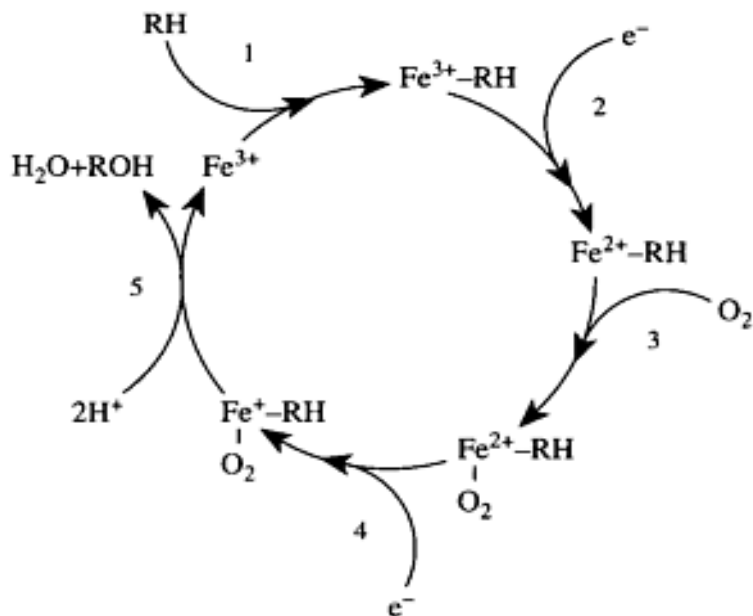


Εικ. 11: Αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής κυτοχρώματος P450. Διακρίνονται οι α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες, η συνδεδεμένη αίμη, καθώς και τα άμινο και καρβόξυ άκρα.

3.1.3 Ο μηχανισμός των P 450 καταλυόμενων αντιδράσεων

Η κύρια δράση των κυτοχρωμάτων P 450 είναι η μονοξυγόνωση διαφόρων υποστρωμάτων, η οποία απαιτεί μοριακό οξυγόνο και την παρουσία αναγωγικών ισοδύναμων από το NADPH ή το NADH για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Τα ευκαρυωτικά P 450, μικροσωμικά ή μιτοχονδριακά, χρησιμοποιούν το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων, ενώ για τα περισσότερα βακτηριακά πηγή ηλεκτρονίων αποτελεί το NADH.

Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται ο κυκλικός μηχανισμός αντίδρασης για τις P 450 καταλυόμενες αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και το σχηματισμό της μορφής των ανηγμένων κυτοχρωμάτων P450, βάσει του οποίου λαμβάνει χώρα εφοδιασμός του κυτοχρώματος με δύο e-, καθένα ξεχωριστά σε δύο διαφορετικά βήματα του ίδιου κύκλου οξυγόνωσης.

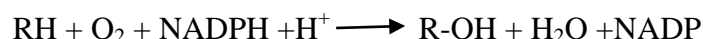


Εικ.12: Ο κυκλικός μηχανισμός αντίδρασης για τις P 450 καταλυόμενες αντιδράσεις οξυγόνωσης (Lewis, 1996a).

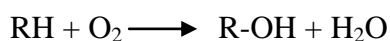
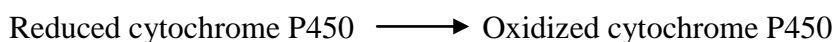
1. Πραγματοποιείται η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου και κατά συνέπεια αλλαγές στις φασματικές ιδιότητες του ενζύμου.
2. Οι μεταβολές που υφίσταται το ενεργό κέντρο του ενζύμου ευνοεί τη μεταφορά του ενός ηλεκτρονίου από NAD(P)H κυτοχρωμικής αναγωγής P450. Το πρώτο ηλεκτρόνιο παρέχεται στο συνδεδεμένο με το υπόστρωμα οξειδωμένο κυτόχρωμα P450 ανάγοντας το σίδηρο της αίμης [Fe^{2+}]
3. Το μοριακό οξυγόνο δεσμεύεται ομοιοπολικά στο σίδηρο της αίμης σχηματίζοντας το σύμπλοκο $Fe^{2+}OOH$ με την προσθήκη ενός πρωτονίου. Η κυστεΐνη ως ισχυρός δότης ηλεκτρονίων ενεργοποιεί σε μεγάλο βαθμό το οξυγόνο με αποτέλεσμα ορισμένες φορές να διασπάται ο δεσμός σιδήρου-οξυγόνου και να ελευθερώνεται μια δραστική ρίζα υπεροξειδίου και να διακόπτεται ο καταλυτικός κύκλος.
4. Το δεύτερο ηλεκτρόνιο παρέχεται στο οξυγονωμένο P450 μέσω του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων
5. Ένα δεύτερο πρωτόνιο διασπά το σύμπλοκο $Fe^{2+}OOH$ και σχηματίζεται νερό και το ασταθές σύμπλοκο $[FeO]^{3+}$ που παραχωρεί το οξυγόνο στο υπόστρωμα
6. Ανάλογα με το υπόστρωμα και το ένζυμο που εμπλέκεται τα κυτοχρώματα P450 μπορούν να καταλύουν οποιαδήποτε αντίδραση πέρα της υδροξυλίωσης που παρουσιάζεται στη παραπάνω εικόνα. Το υπόστρωμα που βρίσκεται δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο του

ενζύμου αντιδρά με το προϊόν σιδήρου που παράχθηκε στο προηγούμενο στάδιο απελευθερώνοντας το τελικό προϊόν υδροξυλίωσης. Το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση

Η χαρακτηριστική αντίδραση που καταλύεται από μια μονοξυγονάση (κυτόχρωμα P450), φαίνεται παρακάτω:



Το RH παραπάνω συμβολίζει ένα μεγάλο αριθμό ξένων ουσιών ή ενδογενών μεταβολιτών όπως στεροειδή, λιπαρά οξέα, ρετινοειδή, κα. Τα υποστρώματα τους, γενικά, είναι λιπόφιλα και καθίστανται περισσότερο υδρόφιλα, μέσω της υδροξυλίωσης. Η αντίδραση που καταλύεται από τα κυτόχρωμα μπορεί ακόμα να παρασταθεί ως ακολούθως:



Το ένζυμο που χρησιμοποιεί το NADPH για το σχηματισμό της ανηγμένης μορφής του κυτόχρωματος, όπως φαίνεται αριστερά στο παραπάνω σχήμα, είναι η NADPH-κυτοχρωμική P 450 αναγωγάση. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADPH στη ρεδοκτάση και εν συνεχεία στο κυτόχρωμα P 450. Έτσι γίνεται η αναγωγική ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, και ένα άτομο εισάγεται ακολούθως στο υπόστρωμα.

4. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ 71Α ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ P450 ΚΑΙ Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ

Τα μονοτερπένια έχουν ανιχνευθεί σε περισσότερα από 2000 φυτικά είδη και μέχρι στιγμής περισσότερα από 3400 διαφορετικά μονοτερπένια έχουν περιγραφεί (Buckingham,2011) Τα

τερπένια προέρχονται από την βασική μονάδα του ισοπρενίου - ισοπεντανίου (C5) και ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Έτσι, τα μονοτερπένια είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και βιοσυντίθενται από δύο μονάδες ισοπρενίου, τα σεσκιτερπένια έχουν 15 άτομα άνθρακα και προέρχονται από τρία μόρια ισοπρενίου. Τα μονοτερπένια αποτελούν τα κύρια συστατικά των περισσότερων αιθέριων ελαίων τα οποία παράγονται και αποθηκεύονται σε εξειδικευμένα φυτικά κύτταρα, αδενικά τριχώματα και αδένες ελαίου (Evans, 2009)

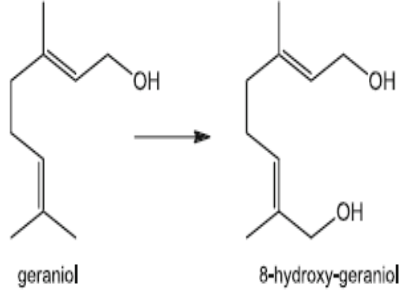
Το 1992 απομονώθηκε το πρώτο φυτικό κυτόχρωμα P450 από το μεσοκάρπιο των ώριμων καρπών του αβοκάντο (*Persea americana*, Lauraceae), το **CYP71A1**. Η ερευνητική ομάδα του Dr. Wallsgrove μελετώντας τις λειτουργικές ιδιότητες του συγκεκριμένου ενζύμου κατέληξε στην υδροξυλίωση των μονοτερπενίων γερανιόλη και νερόλη. Ωστόσο κανένα από αυτά τα μονοτερπένια ούτε και κάποιο από τα παράγωγα τους δεν ανίχνεύθηκαν στους ιστούς του αβοκάντο (Hallahan *et al.*, 1992). Στη συνέχεια, οι μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν πως το CYP71A1 παρουσιάζει την ικανότητα δέσμευσης άλλων υποστρωμάτων, για παράδειγμα καταλύει την αντίδραση μονοοξυγόνωσης δρώντας στο υπόστρωμα p-chloro-N-methylaniline (pCMA). Η λειτουργία του ενζύμου σε *in vivo* μελέτες καθώς και τα φυσικά υποστρώματα παραμένουν ασαφή (Hallahan *et al.*, 1994)

Η ανάλυση Southern blot έδειξε την ύπαρξη ενός ομόλογου με το CYP71A1 κυτοχρώματος P450 που εκφράζεται στα φύλλα του φυτού *Nepeta racemosa*, Lamiaceae και καταλύει την υδροξυλίωση της γερανιόλης και της νερόλης. Το ομόλογο αυτό κυτόχρωμα P450 στο *Nepeta racemosa* έδειξε πως υδροξυλιώνει τα δύο παραπάνω μονοτερπένια στον δέκατο άνθρακα (C10) ενώ το CYP71A1 στο αβοκάντο καταλύει τελικά 2,3- ή 6,7- εποξειδωση (Hallahan *et al.*, 1994)

Τα **CYP71A5** και **CYP71A6** τελικά απομονώθηκαν από τα φύλλα του *Nepeta racemosa*. Η συμμετοχή του CYP71A5 στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων, πιθανώς ως υδροξυλάση της 10-γερανιόλης, είχε συναχθεί από τα πρότυπα έκφρασης σε διάφορους φυτικούς ιστούς και σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Παρόλα αυτά η ενζυμική δραστηριότητα δεν έχει ταυτοποιηθεί μέσω της ετερόλογης έκφρασης (Clark *et al.*, 1997)

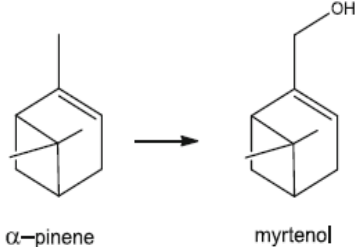
Cytochrome P450	Plant origin	Catalysed reaction	Gen Bank number
71A1	<i>Persea americana</i> (<i>Lauraceae</i>)	<p>nerol → 2,3-epoxynerol (<i>trans</i>-linaloloxide) and 6,7-epoxynerol</p>	M32885
71A1-related	<i>Nepeta racemosa</i> (<i>Lamiaceae</i>)	<p>nerol → 10-hydroxy-nerol → geraniol → 10-hydroxy-geraniol</p>	
71A5	<i>Nepeta racemosa</i>	Proposed function: geraniol-10-hydroxylase; no functional characterization after heterologous expression	Y09423
71A6	<i>Nepeta racemosa</i> (<i>Lamiaceae</i>)		Y09424
71A32	<i>Mentha x piperita</i> (<i>Lamiaceae</i>)	<p>(+)-pulegone → [intermediate] → (+)-menthofuran</p>	AF346833

Η γερανιόλη επίσης λειτουργεί και ως πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση ιριδοειδών μονοτερπενίων και των ινδολαλκαλοειδών (El-Sayed *et al.*, 1997; O'Connor and Maresh, 2006; O'Connor and McCoy, 2006). Με βάση τους εξειδικευμένους αυτούς μεταβολίτες, μέλη της υποοικογένειας CYP76B, που λανθασμένα αναφέρονται ως υδροξυλάσες της 10-γερανιόλης, έχουν μελετηθεί εκτενώς στα φυτά *Catharanthus roseus* (**CYP76B6**) (Collu *et al.*, 2001, Sung *et al.*, 2011) και *Swertia mussoitii* (**CYP76B10**) (Wang *et al.*, 2010) και έχει δειχθεί πως καταλύουν τον σχηματισμό της 8-υδροξυ-γερανιόλης (όχι της 10-υδροξυ-γερανιόλης). Αν και στο *Arabidopsis thaliana*, το CYP76C10 έχει μελετηθεί ως υδροξυλάση της 8-γερανιόλης/νερόλης, η πραγματική λειτουργία του ενζύμου δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί δεδομένου ότι ούτε η 8-υδροξυγερανιόλη ούτε και άλλοι δευτερογενή μεταβολίτες έχουν ανιχνευθεί ακόμη στο *Arabidopsis thaliana* (Bak *et al.*, 2011, Mizutani *et al.*, 1997)

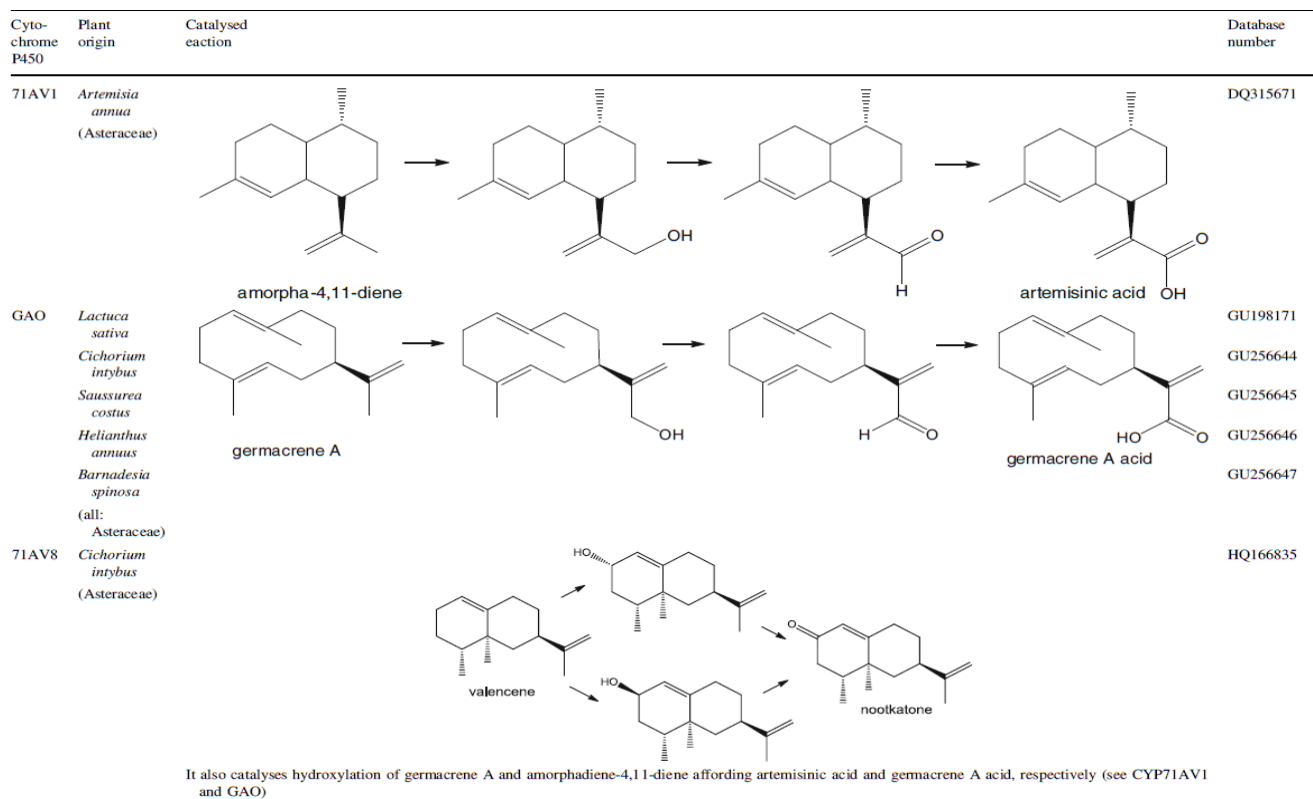
Cytochrome P450	Plant origin	Catalysed reaction	Gen Bank number
76B6	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)		CAC80883
76B10	<i>Swertia mussotii</i> (Gentianaceae)		8-hydroxy-geraniol

Ένα ακόμη κυτόχρωμα που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων είναι το **CYP71A32** (συνθάση της μενθοφουράνης- menthofuran synthase) που καταλύει τη μετατροπή της πουλεγγόνης [(+)-pulegone] σε μενθοφουράνη [(+)-menthofuran] μέσω υδροξυλίωσης (Bertea *et al.*, 2001). Η αντίδραση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ασυνήθιστη δεδομένου ότι το οξυγόνο του φουρανίου δεν προέρχεται από το οξυγόνο του καρβονυλίου αλλά από μοριακό οξυγόνο (Mizutani and Sato, 2011). Ειδικά κάτω από στρεσογόνες συνθήκες ανάπτυξης (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλή ένταση φωτός) η συγκέντρωση της μενθοφουράνης (menthofuran) στο αιθέριο έλαιο μέντας μπορεί να ξεπεράσει το 5% με αποτέλεσμα το έντονο άρωμα και την μείωση του χρώματος κατά την αποθήκευση (Mahmoud and Croteau, 2001).

Η καλλιέργεια της φράουλας (*Fragaria ssp.*) οδήγησε σε μεταβολές στη γεύση και στο άρωμα των φρούτων που αποδίδονται στην παρουσία ή απουσία ορισμένων μονοτερπενίων και διτερπενοειδών. Τόσο οι άγριες όσο και οι καλλιεργούμενες φράουλες εκφράζουν μια υδροξυλάση της πινένης (pinene hydroxylase (PINH) στους ώριμους καρπούς και στη ρίζα του φυτού. Μέσω της ετερόλογης έκφρασης αποδείχθηκε πως το κυτόχρωμα **CYP71AR** υδροξυλιώνει τις ενώσεις α-πινένιο (α-pinene) και λιμονένιο (limonene) παράγοντας μυρτενόλη (myrtenol) και perillyl alcohol (Aharoni *et al.*, 2004).

Cytochrome P450	Plant origin	Catalysed reaction	Gen Bank number
71AR1	<i>Fragaria vesca</i> (Rosaceae)		Sequence published in reference only

Με την ανακάλυψη του κυτοχρώματος **CYP71AV1** (amorpha-4,11-diene οξειδάση) του φυτού *Artemisia annua*, το οποίο καταλύει την οξείδωση της αμορφαδιένης (amorphadiene) σε αρτεμισινικό οξύ (artemisinic acid) καθίσταται για πρώτη φορά δυνατή η βιοτεχνολογική σύνθεση μιας πρόδρομης ένωσης της αρτεμισινίνης (Ro, 2006). Έχουν επίσης πραγματοποιηθεί έρευνες σχετικά με την καταλυτική δράση του ενζύμου σε φυτικά είδη *Nicotiana*. Συγκεκριμένα στο *N. benthamiana* η ταυτόχρονη έκφραση της συνθάσης amorpha-4,11-diene (ADS) με το CYP71AV1 οδηγεί στην παραγωγή του αρτεμισινικού οξέος (artemisinic acid) (Van Herpen *et al.*, 2010). Από την άλλη πλευρά η έκφραση των ίδων ενζύμων στο *N. tabacum* οδηγεί στον σχηματισμό των αλκοολών amorpha-4,11-diene and artemisinic alcohol. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της μελέτης των ενζύμων στο φυτό *Artemisia annua*. Μελέτες για την έκφραση και τον σχηματισμό των δύο αφυδρογονασών (αλκοόλη και αλδεύδη) έδειξαν ότι το CYP71AV1 καταλύει τη παραγωγή τόσο της αλκοόλης όσο και της αλδεύδης αλλά επίσης και πολλές ενδογενείς αφυδρογονάσες του *Artemisia annua* καταλύουν την παραγωγή οξέος και αλδεύδης (Olofsson *et al.*, 2011; Li X *et al.*, 2012). Τα CYP71AV- γονίδια απομονώθηκαν από επτά είδη *Asteraceae* (CYP71AV2–8). Με εξαίρεση το CYP71AV1, τα υπόλοιπα μέλη της υποοικογένειας αποτελούν οξειδάσες της ένωσης germacrene (GAO) με μια εξαιρετικά ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος.



Το κυτόχρωμα CYP71A13, μέλος της μεγαλύτερης και πιο ποικιλόμορφης οικογένειας του *Arabidopsis thaliana* έδειξε να συμμετέχει στον σχηματισμό του ινδολ-αλκαλοειδούς μεταβολίτη

καμαλεξίνη (camalexin) (Nafisi *et al.*, 2007), συμπεραίνοντας ότι τα μέλη της οικογένειας 71 A κατέχουν εξειδικευμένες λειτουργίες μεταξύ και εντός μεμονωμένων ειδών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα λειτουργικά χαρακτηρισμένα P450 που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των τερπενοειδών στα φυτά (Hamberger and Bak, 2013). Ο πίνακας έχει δημιουργηθεί με βάση τις ομάδες γονιδίων που προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (clans). Η κάθε γενιά έχει ονομαστεί με τον αριθμό της πρώτης οικογένειας που ταξινομήθηκε στον κλάδο. Τα φυτικά κυτοχρώματα P450 έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις κύριες γενιές (Nelson, 1999):

- **71 clan:** περιλαμβάνει 25 από τις 47 οικογένειες των φυτικών P450
- **72 clan:** αποτελείται από τις οικογένειες CYP 72, 709, 714, 715
- **85 clan:** συμπεριλαμβάνει τις οικογένειες CYP 85, 87, 88, 90, 702, 707, 708, 716, 718
- **86 clan:** κατατάσσονται οι οικογένειες CYP 86, 94, 96, 704

Κατά την ανάλυση του σχετικού αριθμού των P450 ανά γενιά, είναι προφανές ότι ορισμένες γενιές έχουν επεκταθεί περισσότερο από άλλες και σε αυτό οφείλεται η διαφοροποίηση στις λειτουργίες των μελών της. Χαρακτηριστικό των γενιών CYP51, 710, 711, 74 είναι η συμμετοχή τους σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως ο σχηματισμός στερολών στις μεμβράνες ή ο σχηματισμός φυτο-ορμονών για την ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών. Σε αντίθεση η γενιά CYP71 έχει επεκταθεί περισσότερο και περιλαμβάνει P450 που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των περισσότερων εξειδικευμένων φυτικών ενώσεων (Hamberger and Bak, 2013).

clan subfamily metabolism function, class of metabolites

CYP51 CYP51G general triterpenoid sterols

CYP51H specialized triterpenoid

CYP71 CYP71A specialized monoterpene

CYP71AR specialized monoterpene

CYP71AV specialized sesquiterpenoid

CYP76B specialized iridoid monoterpene, xenobiotics detoxification

CYP71BA specialized sesquiterpenoid

CYP71BL specialized sesquiterpenoid

CYP71D specialized mixed, including: monoterpene, sesquiterpenoid, diterpenoid, indole alkaloid, flavonoid

CYP71Z specialized diterpenoid

CYP76M specialized diterpenoid

CYP82G specialized terpenoid-derived

CYP93E specialized triterpenoid

CYP99A specialized diterpenoid

CYP701A general diterpenoid phytohormone GA

CYP701A specialized diterpenoid

CYP705A specialized triterpenoid

CYP706B specialized sesquiterpenoid

CYP710 CYP710A general triterpenoid phytohormone brassinolide

CYP711 CYP711A general terpenoid signal molecule

CYP72 CYP72A specialized monoterpene indole alkaloid, triterpenoid

CYP72C general triterpenoid phytohormone brassinolide

CYP714A general diterpenoid phytohormone GA

CYP714D general diterpenoid phytohormone GA

CYP734A general triterpenoid phytohormone brassinolide

CYP85 CYP85A general triterpenoid phytohormone brassinolide

CYP88A	general	diterpenoid phytohormone GA
CYP88D	specialized	triterpenoid
CYP90A	general	triterpenoid phytohormone brassinolide
CYP90B	general	triterpenoid phytohormone brassinolide
CYP90C	general	triterpenoid phytohormone brassinolide
CYP90D	general	triterpenoid phytohormone brassinolide
CYP707A	general	terpenoid phytohormone ABA
CYP708A	specialized	triterpenoid
CYP716A	specialized	triterpenoid
CYP720B	specialized	diterpenoid
CYP725A	specialized	diterpenoid
CYP86	CYP724B general	triterpenoid phytohormone brassinolide
CYP97	CYP97A general	carotenoids
	CYP97B general	carotenoids
	CYP97C general	carotenoids

*ΥΛΙΚΑ
ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ*



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από την ελιά *O. europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*, καλλιεργήσιμης ελαιοπαραγωγού ποικιλίας "Κορωνέικη". Πρόκειται για μικρόκαρπη, όψιμη ποικιλία με ευρύ χρόνο συγκομιδής που ξεκινά από τα τέλη Νοεμβρίου και φτάνει έως τον Ιανουάριο στις βόρειες περιοχές. Συγκεκριμένα επελέγη η απομόνωση RNA από νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα ελιάς τα οποία συλλέχθηκαν τέλη Ιανουαρίου. Μετά την συλλογή και την ομογενοποίηση του φυτικού ιστού σε υγρό άζωτο ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA .

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA) ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

- Ποσότητα νωπού ή διατηρούμενου στους -80°C φυτικού ιστού λειοτριβείται σε γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου
- Το δείγμα μεταφέρεται σε eppendorfs, όπου για κάθε 0,1gr ιστού. προστίθενται 100μl διαλύματος ομογενοποίησης (RNA extraction buffer) και 100μL φαινόλης. Ακολουθεί έντονη ανάμειξη (vortex).
- Ακολουθεί φυγοκέντριση για 4 min στις 13000 rpm. Δημιουργούνται δύο φάσεις, η υδατική και η οργανική.
- Το υπερκείμενο (υδατική φάση) μεταφέρεται με προσοχή σε καινούριο eppendorf και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης.
- Έντονη ανάμειξη (vortex) και φυγοκέντριση για 4 min στις 13000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμλικής αλκοόλης (25:24:1). Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντριση για 4 min στις 13000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf, προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιο: ισοαμλική αλκοόλη (24:1) και αναδεύεται έντονα.
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση του δείγματος.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο eppendorf και προστίθενται 1/10 του όγκου του CH_3COONa 3M, pH=4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης (100% EtOH). Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και το δείγμα επωάζεται στους -20°C για 12 ώρες τουλάχιστον ή στους -80°C για 30min, για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων.

- Ακολουθεί φυγοκέντριση για 35min στις 13000rpm, στους 4°C.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει. Στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C.

Διαλύματα απομόνωσης και καθαρισμού νουκλεϊνικών οξέων

- **RNA extraction buffer**
100μM Tris-HCl pH=9, 0,5% SDS (w/v) (Sodium dodecyl sulfate)
- **SEVAG**
24 χλωροφόρμιο: 1 ισοαμυλική αλκοόλη
- **Φαινόλη (pH 8.0)**

3. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΜΕ DNAση

Η διαδικασία πραγματοποιείται μετά την απομόνωση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA, πριν πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα DNA που θα αλλοίωναν τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR στη συνέχεια, καθώς το DNA θα αποτελούσε ανταγωνιστικό του cDNA υπόστρωμα της αντίδρασης.

Η διαδικασία γίνεται με τη χρήση του ενζύμου **DNaseI (RNase-free)** της εταιρείας BioLab (2u/μl), που αποδομεί μονό- και δι-κλώνα μόρια DNA ενδονουκλεολυτικά, παράγοντας 3'-υδροξυλιωμένα και 5'-φωσφορυλιωμένα νουκλεοτίδια. Αναλυτικά:

- Σε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται :
 1. 10-20 μgr ολικό RNA
 2. DNase ρυθμιστικό διάλυμα 10x,σε τελική συγκέντρωση 1x
 3. 1μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(40u/μl)
 4. 2,5μl DNase I (RNase- free) (2u/μl).
 5. ddH₂O, μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης.

- Το δείγμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.
- Ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων μέσω της μεθόδου φαινόλης:χλωροφορμίου και καθίζηση με αιθανόλη, αφού πρώτα αυξηθεί ο όγκος του μίγματος στα 200-400 μl, με προσθήκη ddH₂O, για ευκολία στους χειρισμούς. Συνίσταται η ανάλυση 1-2 μl από το δείγμα σε πηκτή αγαρόζης 0,8 ή 1%, για επιβεβαίωση της αποδόμησης του DNA, χωρίς καταστροφή του RNA.
- Ακόμη σκόπιμος είναι και ο εκ νέου προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA φασματοφωτομετρικά.

4. ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ –RT

Η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού cDNA, από ποσότητα ολικού RNA. Συνήθως 1-2,5 μgr ολικό RNA μεταγράφεται ανάστροφα με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου **SuperScript™II Reverse Transcriptase**, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση που πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 20 μl. Αναλυτικά:

➤ 1^ο βήμα

Σε φιαλίδιο PCR χωρητικότητας 0,5 ml, προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά:

- ✓ 1-2,5 μgr ολικό RNA
- ✓ Εκκινητής: ολιγο-dT σε τελική συγκέντρωση 25μM.
- ✓ dNTPs(10mM το καθένα) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM.
- ✓ Προστίθεται ddH₂O, μέχρι συμπλήρωσης του κατάλληλου όγκου.

Το μίγμα αναμιγνύεται και θερμαίνεται 5 min στους 65°C για να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη. Ακολούθως τοποθετείται κατευθείαν στον πάγο.

➤ 2^ο βήμα

Το δείγμα φυγοκεντρείται για μερικά δευτερόλεπτα και προστίθενται:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης(5x), σε τελική συγκέντρωση 1x.
- ✓ DTT(100mM), σε τελική συγκέντρωση 10mM.
- ✓ 1μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40u/μl)
- ✓ 1μl SuperScript™II (200u/μl)

Τα δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στους 42°C για 1 ώρα, όπου στη θερμοκρασία αυτή δρουν τα ένζυμα.

Η αντίδραση τερματίζεται με τοποθέτηση των δειγμάτων στους 70°C για 15 min.

- **Superscript™ Reverse Transcriptase (200u/μl)**

Storage Buffer: 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol

- **RNase Out (40u/ μl)**

Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 8.0), 50mM KCl, 0.5mM EDTA, 8mM DTT, 50% (v/v) glycerol

- **1X DNase I Reaction Buffer (NEB)**

10M Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.6 @ 25°C

- **DNase I (RNase- free) (2u/λ)**

2mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 50% glycerol

- **dNTPs**

10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP, σε ddH₂O

5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

5.1. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική εκείνη κατά την οποία μόρια εξαναγκάζονται να κινηθούν διαμέσου ενός πορώδους υλικού, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η χαρακτηριστική ιδιότητα των νουκλεϊνικών οξέων που τα καθιστά ικανά να κινούνται σε ένα τέτοιο περιβάλλον είναι το αρνητικό τους φορτίο. Ο διαχωρισμός των τμημάτων γίνεται βάσει του μοριακού τους βάρους, καθώς η κινητικότητά τους στην πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μεγέθους τους. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να αναλυθούν και συνήθως κυμαίνεται από 0,6-2% w/v. Η ανίχνευση των μορίων είναι δυνατή χάρη στην προσθήκη

βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις των μορίων DNA με αποτέλεσμα αυτά να φθορίζουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για την ανάλυση των ριβονουκλεϊνικών οξέων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται στον ανάλογο όγκο νερού (w/v) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως, οπότε το μίγμα καθίσταται διαυγές.
- Προστίθεται η ανάλογη ποσότητα TAE (πυκνό διάλυμα 50x), ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x.
- Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα EtBr (10mg/mL), ώστε η τελική συγκέντρωση στην πηκτή να είναι 0.5 $\mu\text{g/mL}$
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει λίγο και έπειτα τοποθετείται σε δοχείο- καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης στο οποίο έχουν προσαρτηθεί τα αντίστοιχα χτενάκια για την δημιουργία θέσεων προσθήκης διαλύματος νουκλεϊνικών οξέων.
- Μετά την στερεοποίηση του πηκτώματος αγαρόζης, αφαιρούνται τα χτενάκια και τοποθετείται το δοχείο-καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρείται με ρυθμιστικό διάλυμα.
- Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται μικρή ποσότητα κατάλληλης μπλε χρωστικής.
- Τα δείγματα εισάγονται στα πηγαδάκια και εφαρμόζεται τάση στα άκρα της συσκευής, που ανάλογα με το μέγεθος της πηκτής, την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη, και την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού κυμαίνεται από 50-120 Volt.
- Το πήκτωμα αγαρόζης εξετάζεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

- **TAE (50x)**
24,2 gr Tris-base, 100ml 0.5M EDTA pH=8 (ethylenediaminetetracetic acid disodium salt), 57ml CH₃COOH ανά 1lt διαλύματος.
- **Ethidium Bromide**
10mg/ml νερό. Αποθήκευση σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης**
1x TAE, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EtBr
- **Διάλυμα χρωστικής**
1x μητρικού διαλύματος χρωστικών(5x) που περιέχει 0,25% (w/v) bromophenol blue και 0,25% (w/v) xylene cyanol σε νερό, 40% (w/v) σουκρόζη.

5.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλειϊκών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλειϊκών οξέων έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) στα 240nm, 260nm και στα 280nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο U-1100 της Hitachi. Τα νουκλειϊκά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm και η συγκέντρωσή τους υπολογίζεται από τον τύπο *Beer-Lambert*. Σε μήκος κύματος 280nm απορροφούν κυρίως οι πρωτεΐνες εξαιτίας της περιέχουσας τρυπτοφάνης, ενώ στα 240nm απορροφούν τα φαινολικά παράγωγα. Επομένως ο λόγος OD_{260}/OD_{280} αντιπροσωπεύει την καθαρότητα των νουκλειϊκών οξέων. Ο ιδανικός λόγος, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ισούται με 1.8 για DNA και 2 για RNA, ενώ όταν υπάρχουν προσμίξεις ο λόγος αυτός μειώνεται. Ο λόγος OD_{240}/OD_{260} πρέπει να είναι περίπου 0.5. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλειϊκών οξέων γίνεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$C(\mu\text{g}/\text{ml}) = O.D. (260\text{nm}) * a * D.F.$$

Όπου:

a ορίζεται η συγκέντρωση των νουκλειϊκών οξέων που παρατηρείται όταν $O.D.260=1.0$ και διαμορφώνεται ως εξής για δείγμα DNA, $a=50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ενώ για RNA, $a=40 \mu\text{g}/\text{ml}$.

D.F. = συντελεστής αραιώσης και ισούται με την αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει η φασματοφωτομέτρηση.

5.3. Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση κλάσματος DNA από δείγμα, πρωταρχικό βήμα αποτελεί ο διαχωρισμός του μέσω ηλεκτροφόρησης. Μέγιστη δυνατή ποσότητα δείγματος, ώστε να αποδώσει επαρκή ποσότητα κλάσματος, ηλεκτροφορείται σε χαμηλή τάση σε πηκτή αγαρόζης 0,8-2%, μέχρις ότου επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός του επιθυμητού τμήματος από τα υπόλοιπα. Η πηκτή τοποθετείται σε γυάλινη πλάκα, και με τη βοήθεια υπεριώδους φωτισμού, εξαιρείται το τμήμα της πηκτής που περιέχει το επιθυμητό κλάσμα. Το τμήμα της πηκτής μεταφέρεται σε φιαλίδιο eppendorf, ζυγίζεται και ακολουθεί καθαρισμός του βάσει του πρωτοκόλλου που αναφέρεται στο εμπορικό σκεύασμα *NucleoSpin Geland PCR Clean-up (Macherey- Nagel)*.

5.4. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένη ακολουθία DNA και κόβουν εντός ή εκτός αυτής. Διαχωρίζονται σε τρεις τύπους εκ των οποίων τα περιοριστικά ένζυμα της ομάδας II χρησιμοποιούνται ως επί των πλείστον στους γονιδιακούς χειρισμούς. Αναγνωρίζουν συμμετρικές αλληλουχίες (παλίνδρομα), αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και απαιτούν για την δράση τους Mg^{2+} . Τα ένζυμα της ομάδας II, αφού αναγνωρίσουν μια συγκεκριμένη ακολουθία, κόβουν τη δίκλωνη αλυσίδα είτε μέσα στην ακολουθία αυτή είτε πολύ κοντά σε αυτή, αποτέλεσμα του οποίου είναι η δημιουργία διακριτών τμημάτων DNA ορισμένου μεγέθους και αλληλουχίας των άκρων. Το κάθε ένζυμο περιορισμού δρα σε συγκεκριμένες συνθήκες (ιοντική ισχύς, θερμοκρασία και pH).

Οι αντιδράσεις πέψης γίνονται σε μικρούς όγκους, 20-50μl, με προσθήκη των κάτωθι συστατικών:

- Δείγμα DNA, μέχρι αναλογίας 80% του τελικού όγκου της αντίδρασης
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10x), σε τελική συγκέντρωση 1x.
- Ενδονουκλεάση περιορισμού: ποσότητα αναλόγως με τις μονάδες ενζύμου.

Ως **μονάδα ενζύμου** ορίζεται η απαιτούμενη ποσότητα ώστε να κοπεί πλήρως 1 μg υποστρώματος DNA, σε μια ώρα και σε αντίδραση όγκου 50μl, στους 37°C.

- ddH₂O, μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης.
 - BSA (10x, 10 μg/mL), σε τελική συγκέντρωση 1x.
- Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στους 37°C, από 1 -12 ώρες. Η θερμοκρασία επώασης αντιστοιχεί στην άριστη θερμοκρασία δράσης που ποικίλει για τα διάφορα ένζυμα, που στην πλειοψηφία τους, όμως, λειτουργούν άριστα στους 37°C.

6.ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

6.1 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα.

Η διαδικασία της ενοποίησης στηρίζεται στην ιδιότητα της T₄ DNA λιγάσης να αναγνωρίζει άκρα και να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Οι χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς καθίστανται γραμμικοί μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού, οπότε και είναι δυνατή η ενοποίησή τους με κατάλληλο τμήμα DNA, μέσω της λιγάσης. Η ποσότητα του ένθετου DNA που απαιτείται εξαρτάται από το μήκος της ένθεσης και από το μήκος του φορέα που προκύπτει από την ακόλουθη εξίσωση:

$$ng \text{ ένθεσης} = [(ng \text{ φορέα} * kb \text{ ένθεσης}) / (kb \text{ φορέα})] * 1/3$$

Τα συστατικά της αντίδρασης και οι τελικές συγκεντρώσεις παρουσιάζονται παρακάτω:

- 10x ρυθμιστικό διάλυμα : 2μl
- Πλασμιδιακός φορέας: Y ng
- Ένθεση : X ng
- T4 DNA ligase (5U/ μl, Thermo scientific): 1μl
- ddH₂O : εώς τελικό όγκο

Τελικός όγκος αντίδρασης 20 μl

Επώαση στους 16°C O/N

6.2 Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων έγκειται στην επιτυχή εισαγωγή πλασμιδιακού DNA στα βακτηριακά κύτταρα.

- Τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα αφήνονται για λίγο στον πάγο για να ξεπαγώσουν.
- Σε 100-200μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και τοποθέτηση αυτών στον πάγο για 30λεπτά.
- Στη συνέχεια μεταφέρονται στους 42°C για 45-90 sec
- Προσθήκη θρεπτικού μέσου LB έως ότου ο τελικός όγκος να φτάσει στο 1,5ml.
- Ανάμειξη του δείγματος και επώαση στους 37°C για 1- 1,5 h

- Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντριση για 1,5min και απομάκρυνση του περισσότερου υπερκείμενου. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100-200μl LB.
- Κατάλληλη ποσότητα του εναπομείναντος δείγματος επιστρώνεται σε τριβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη).

Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/ άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη, στο θρεπτικό μέσο, του χρωμοφόρου υποστρώματος X- gal(20 mg/ml) και του παράγοντα IPTG(200 mg/ml) που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου

- Τα τριβλία τοποθετούνται στον θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 37°C για 12-16h

6.3 Δημιουργία βακτηριακών δεκτικών κυττάρων *E. coli* για χημικό μετασχηματισμό

Σκοπός της μεθοδολογίας που ακολουθεί είναι η μεταχείριση βακτηριακών κυττάρων ώστε να είναι εφικτή η εισαγωγή πλασμιδίου σε αυτά, δηλαδή ο μετασχηματισμός τους.

- Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους *E.coli* (DH5a, XL1BLUE, BL21, M15) αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο LB (με κατάλληλο αντιβιοτικό) σε ανακινούμενο θάλαμο, με θερμοκρασία 37°C για 12h.
- Από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται 2ml σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε αναδεδυόμενο θάλαμο, σε θερμοκρασία 37, έως ότου η οπτική πυκνότητα – σε μήκος κύματος 550nm- να φτάσει OD₅₅₀= 0.5
- Φυγοκέντριση στις 5000rpm για 5min στους 4°C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται στο ½ του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας, σε διάλυμα CaCl₂ 25mM, σε 10mM Tris-HCl pH=8
- Φυγοκέντριση στις 5000rpm για 5min στους 4°C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται στο 1/15 του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας, σε διάλυμα CaCl₂ 75mM, σε 10mM Tris-HCl pH=8, 15% γλυκερόλη.
- Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερόλη, ώστε η τελική συγκέντρωση αυτής να είναι 15% κατά όγκο

- Αφού γίνει καλή ανάδευση του μίγματος, μοιράζεται σε erpendorfs και καταψύχεται αμέσως με υγρό άζωτο
- Τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν αποθηκευμένα στους -80°C για αρκετά μεγάλα χρονικά διαστήματα.

6.4 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

- Μονή αποικία των προς αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων, εμβολιάζεται σε υγρό θρεπτικό μέσο (συνήθως LB) με το κατάλληλο αντιβιοτικό, έτσι ώστε το στέλεχος *E. coli* να παρουσιάζει ανθεκτικότητα και ταυτόχρονα να προστατεύεται από ανεπιθύμητες μολύνσεις.
- Η καλλιέργεια επωάζεται για 12 ώρες στους 37°C
- Σε φιαλίδιο erpendorf μεταφέρονται 600-800 μl της καλλιέργειας και προστίθενται 300 μl γλυκερόλης 100%.
- Το μίγμα αναμιγνύεται επαρκώς και ψύχεται με υγρό άζωτο.
- Η αποθήκευση και διατήρηση των κυττάρων για αρκετά χρόνια γίνεται στους -80°C .

Βακτηριακά κύτταρα-μετασχηματισμός

- **25mM CaCl₂** σε 10mM Tris-HCl pH=8
0,376 gr CaCl₂ για διάλυμα 100 mL.
- **75mM CaCl₂** σε 10mM Tris-HCl pH=8.
1,1 gr CaCl₂ για διάλυμα 100 mL.
- **LB θρεπτικό μέσο**
0,5% yeast extract, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) peptone. Για το στερεό μέσο προστίθεται και 1,4% (w/v) bacteriological agar.
- **X-gal (5-promo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside)**
20mg/ml διμεθυλ-φορμαμίδιο. Φυλάσσεται στους -20°C
- **IPTG (1sopropyl-b-D-thiogalactopyranoside)**
200mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C

7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

7.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

- Μονή βακτηριακή αποικία που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C. Η καλλιέργεια γίνεται σε φιαλίδια universal που περιέχουν 5 ml θρεπτικού με την κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού
- 1.5ml αυτής της καλλιέργειας μεταφέρεται σε erpendorf και φυγοκεντρείται για 2min στις 13000rpm

7.2 Μέθοδος αλκαλικής λύσης

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl κρύου διαλύματος P₁, με προσοχή να μη δημιουργούνται φυσαλίδες.
- Προστίθενται 200 μl διαλύματος P₂, το δείγμα ανακινείται αργά (όχι για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 5 min, μέχρι το επόμενο βήμα).
- Προστίθενται 200 μl κρύου διαλύματος P₃ και το δείγμα ανακινείται μέχρι να σχηματιστούν λευκές γραμμές (κυτταρικά τοιχώματα) στο διάλυμα.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13000rpm για 15 min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 2 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100%. Το μίγμα αναμιγνύεται καλά.
- Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13000rpm για 10 min.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20-50 μl ddH₂O.

Το δείγμα μπορεί να φυλάσσεται στους -20°C, για αρκετό χρόνο

Διαλύματα χειρισμού και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- **P1 διάλυμα αλκαλικής λύσης**
20μl 0,5M EDTA, 50 μl 10mM Tris-HCl pH=8, 10μl RNase (Invitrogen, 40U/μl) και 920μl ddH₂O, για 1ml
- **P2 διάλυμα αλκαλικής λύσης**
50μl 1% SDS, 20μl 10N NaOH, 930μl ddH₂O
- **P3 διάλυμα αλκαλικής λύσης**
3M CH₃COOK/5M CH₃COOH
60 ml από 5M Potassium Acetate, 11,5 mL οξικό οξύ και 28,5mL ddH₂O
για σύνολο 100ml

RNase: Ribonuclease A from Bovine pancreas (Sigma)

10mg/ml σε 10mM Tris- HCl pH= 7.4, 15mM NaCl

8. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

8.1 Η μέθοδος της PCR

Η μέθοδος αποτελεί μια τεχνική για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων ακολουθιών DNA, με την ταυτόχρονη επιμήκυνση δύο συμπληρωματικών αλυσίδων ξεκινώντας από 2 εκκινητές. Στηρίζεται στην ιδιότητα της πολυμεράσης να συνθέτει τη συμπληρωματική μιας μονόκλωνης αλυσίδας DNA-μήτρας με διεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από μια δίκλωνη περιοχή. Το PCR χρησιμοποιεί την ίδια αρχή, με τη χρήση όμως 2 εκκινητών, έκαστος των οποίων υβριδίζει σε αντίθετες αλυσίδες της περιοχής του DNA που έχουν αποδιαταχθεί θερμικά. Για την αντίδραση απαιτούνται: δεοξυ-τριφωσφορικά νουκλεοτίδια-dNTPs για παροχή ενέργειας και νουκλεοσιδίων για το DNA, θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, εκκινητές, μήτρα DNA και ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μαγνήσιο.

Μια τυπική αντίδραση PCR απαιτεί συγκεκριμένη περιεκτικότητα αντιδραστηρίων, όπως αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Συστατικά	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Μήτρα DNA	-	-
Ρυθμιστικό διάλυμα	5x	1x
dNTPs	2 mM	200μM (το καθένα)
Ορθός εκκινητής	5 μM	0,5 μM
Ανάστροφος εκκινητής	5 μM	0,5 μM
DNA πολυμεράση (<i>Phusion</i> TM <i>High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes</i>)	2unit/ μl	1unit
ddH ₂ O	κατάλληλη ποσότητα για συμπλήρωση του όγκου στα 50 μl	

Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει **MgCl₂** σε συγκέντρωση 15Mm, (5x Phusion HF Buffer F-518).

*HPhusion*TM *High-Fidelity DNA Polymerase* της *Finnzymes* (F- 530S) έχει την ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών κατά τον πολυμερισμό του DNA μειώνοντας την πιθανότητα λάθους κατά την είσχυση των επιθυμητών τμημάτων.

- Κατάλληλη ποσότητα από κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προστίθεται σε φιαλίδιο PCR χωρητικότητας 0,5 ml, το μίγμα αναμιγνύεται και φυγοκεντρείται για μερικά sec. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε πάγο.
- Τα φιαλίδια τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής PCR (χρησιμοποιήθηκε η συσκευή PCR C100TM Thermal Cycler), που προγραμματίζεται στο κατάλληλο πρόγραμμα.

Κάθε κύκλος ενός προγράμματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελείται από τρία βασικά στάδια:

ι.Αποδιάταξη του DNA με θέρμανση, που οδηγεί σε σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και μετατροπή των δίκλωνων μορίων σε μονόκλιωνα

ii.Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές θέσεις της ακολουθίας στόχου, με άνοδο της θερμοκρασίας και εκ νέου σχηματισμό δεσμών υδρογόνου

iii.Επιμήκυνση του DNA, βάσει της πολυμεράσης, η οποία προσδένεται στο σύμπλοκο εκκινητή-μήτρας, αποσπά dNTPs απ' το διάλυμα και πολυμερίζει με διεύθυνση 5'-3'.

Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται πολλές φορές και σε κάθε επανάληψη συντίθεται και μια νέα διπλή έλικα DNA που θα αποτελέσει μήτρα για τον επόμενο κύκλο.

Αριθμός κύκλων	Στάδιο
1	Αποδιάταξη στους 90-98°C
25- 45	Αποδιάταξη στους 90-98°C για 30'' Υβριδισμός εκκινητών στους 45-72°C για 10-40 '' Επιμήκυνση στους 72°C για 15-30 s /1 kb
1	Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5-10'

- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0,8-1,2%.

Το παραπάνω αποτελεί ένα γενικευμένο προφίλ θερμοκρασιών και σταδίων PCR αντίδρασης, που ανάλογα με τις επιθυμητές εφαρμογές και ιδιαιτερότητες κάθε δείγματος, επιδέχεται μεγάλο αριθμού παρεμβάσεων. Επιπλέον, Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για να ρυθμίζουν τη δυναμική ισορροπία προς το επιθυμητό προϊόν αποτελούν:

1. **Hot-Start PCR** (D' Aquila *et al.*, 1991; Erlich. *et al.*, 1991; Ruano *et al.*, 1992)

Περιλαμβάνει την συμπλήρωση το μίγματος της αντίδρασης- συνήθως με το ένζυμο-σε μια υψηλή θερμοκρασία, ώστε να αποτραπεί ο υβριδισμός και η επιμήκυνση από μη επιθυμητές ακολουθίες, που μπορεί να συντελείται λόγω των μη εξειδικευμένων συνθηκών που επικρατούν κατά τη μετάβαση από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στο πρώτο βήμα αποδιάταξης (94°C).

2. **Touchdown PCR** (Don *et al.*, 1991)

Είναι μια τεχνική κατά την οποία λαμβάνει χώρα σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού, κυρίως κατά τους πρώτους κύκλους, ώστε ο αρχικός υβριδισμός να συντελεστεί μόνο στις ακολουθίες που παρουσιάζουν απόλυτη ομολογία με τους εκκινητές.

Ο υβριδισμός των εκκινητών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ανάλογη με την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% των υβριδίων εκκινητή-μήτρας DNA έχει αποχωριστεί. Υπολογίζεται δε, από την παρακάτω εξίσωση:

$$T_m = 69.3^{\circ}\text{C} + 0.41 * (\text{G} + \text{C})\% - 650 / (\text{μήκος εκκινητή})$$

Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών εξαρτάται από το περιεχόμενο των εκκινητών σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) και από τον αριθμό βάσεων αυτών. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών συνήθως κυμαίνεται 2°C κάτω από το T_m των εκκινητών. Ωστόσο δύναται να υπάρχουν διακυμάνσεις ανάλογα με τις ιδιότητες της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Γενικά όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία υβριδισμού από το T_m των εκκινητών, τόσο λιγότερο αυστηρές είναι οι συνθήκες υβριδοποίησης, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη-ειδικών, ανεπιθύμητων, τμημάτων DNA. Οι ιδιότητες της εκάστοτε χρησιμοποιούμενης πολυμεράσης καθορίζουν την θερμοκρασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης, καθώς και την χρονική διάρκεια των παραπάνω σταδίων.

8.2 Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σημαντικότερος ίσως παράγοντας για μια επιτυχημένη αντίδραση PCR είναι ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών. Ο στόχος είναι η επίτευξη της ισορροπίας μεταξύ δύο παραμέτρων:

- A. Την ενίσχυση της εξειδίκευσης, η οποία εξηγείται ως η συχνότητα με την οποία συμβαίνει ένας λάθος υβριδισμός του εκκινητή
- B. Την ενίσχυση της παραγωγικότητας, η οποία αναφέρεται στην προσέγγιση της ποσότητας στη θεωρητική τιμή του διπλασιασμού του προϊόντος για κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ακόλουθες, απαραίτητες ιδιότητες που πρέπει να έχει ο κάθε εκκινητής:

- Το μήκος του κάθε εκκινητή κυμαίνεται μεταξύ 18-30 βάσεις
- Το περιεχόμενο του εκκινητή σε GC% να είναι κοντά στο 50%
- Το 3' άκρο του εκκινητή να περιέχει ελεγχόμενο ποσοστό σε νουκλεοτίδια G, C (συνήθως όχι πάνω από 50%)
- Ο εκκινητής δεν πρέπει να σχηματίζει βρόγχους και διμερή με τον εαυτό του
- Ο ορθός και ο ανάστροφος εκκινητής να μην σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους και να έχουν παρόμοια T_m

- Να υπάρχει ισόποση και ομοιόμορφη κατανομή όλων των νουκλεοτιδίων κατά μήκος του εκκινητή

8.3 RACE-PCR: RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS

Για την μελέτη της δομής και της έκφρασης γονιδίων, είναι απαραίτητο να υπάρχει ακέραιο και ολόκληρο το cDNA. Παλαιότερες μέθοδοι, όπως σάρωση cDNA βιβλιοθήκης, απαιτούσαν πολύ κόπο και κυρίως πολύ χρόνο ώστε να εξασφαλίσουν κάτι τέτοιο. Νεότερες μέθοδοι αναπτύχθηκαν λοιπόν, ενισχύοντας ακολουθίες, προερχόμενες από μήτρα mRNA μεταξύ μιας εσωτερικής, γνωστής περιοχής και μιας άγνωστης περιοχής, ενός από τα δύο άκρα του γονιδίου (3' ή 5' άκρο).

• 3' RACE

Η τεχνική χρησιμοποιεί την πολυαδενυλιωμένη ουρά που υπάρχει φυσιολογικά στο ευκαρυωτικό mRNA σαν μια γενική θέση εκκινητή για την ενίσχυση της PCR. Στην διαδικασία αυτή τα mRNA μετατρέπονται σε cDNA, μέσω ανάστροφης μεταγραφής, με τη χρήση ενός ολιγο-dT εκκινητή. Το cDNA-στόχος ενισχύεται, στη συνέχεια, μέσω PCR με τη χρήση ενός εξειδικευμένου ορθού εκκινητή από τη γνωστή εσωτερική ακολουθία (*gene specific primer-GSP*) και ενός ανάστροφου εκκινητή που στοχεύει στη poly(A) ουρά του μηνύματος. Έτσι μπορούν να απομονωθούν 3' - mRNA ακολουθίες που εκτείνονται μεταξύ του εσωτερικού τμήματος και της poly(A) ουράς.

• 5' RACE

Αποτελεί μια τεχνική που καθιστά δυνατή την απομόνωση των 5' άκρων από σπάνια μηνύματα. Η βασική στρατηγική στηρίζεται στην ανάστροφη μεταγραφή του μηνύματος με τη χρήση εξειδικευμένου ανάστροφου εκκινητή (**GSP1**), γεγονός που επιτρέπει τη μετατροπή σε cDNA του ζητούμενου mRNA-στόχου, ή συγγενών mRNA, αυξάνοντας, έτσι την πιθανότητα πλήρους επέκτασης ως το 5' άκρο του μηνύματος. Ακολούθως λαμβάνει χώρα αποδόμηση της μήτρας mRNA και το μονόκλωνο cDNA προϊόν καθαρίζεται από μη ενσωματωμένα dNTPs και μόρια του GSP1, για αύξηση της απόδοσης και επιτυχίας του επόμενου κρίσιμου βήματος της ακραίας επέκτασης (**tailling**). Το ένζυμο TdT (τελική δεοξυ νουκλεοτιδική τρανσφεράση) χρησιμοποιείται για την προσθήκη ομοπολυμερών ουρών στο 3' άκρο του cDNA. Ακολούθως το επιμηκυμένο cDNA ενισχύεται με PCR, με τη χρήση ενός ή περισσότερων ανάστροφων εσωτερικών εκκινητών (**nested GSP**), και ενός ορθού εκκινητή που στοχεύει στη ομοπολυμερή ουρά του cDNA. Αυτό επιτρέπει την ενίσχυση τμημάτων μεταξύ του εσωτερικού εκκινητή και του 5' άκρου του mRNA.

Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πληθώρα εφαρμογών για την ενίσχυση και κλωνοποίηση σπάνιων μεταγραφημάτων, που ήταν εξαιρετικά δύσκολη για τις συμβατικές τεχνικές, υπερτερώντας ουσιαστικά στην ταχύτητα της ανάλυσης των προϊόντων του RT, η οποία μπορεί να συντελεστεί μια με δύο μέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Η μέθοδος μπορεί ακόμα να εφαρμοστεί και σε ήδη υπάρχουσες βιβλιοθήκες, ή, σε συνδυασμό με μεθόδους όπως το εκφυλισμένο PCR, για την απομόνωση και το χαρακτηρισμό άγνωστων ακολουθιών.

9. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Τα *E. coli* ως βακτηριακά κύτταρα έκφρασης χρησιμοποιούνται ευρύτατα εξαιτίας του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης και των σημαντικών επιπέδων έκφρασης που παρουσιάζουν. Παρόλα το σύστημα έκφρασης του *E.coli* φέρει και κάποια μειονεκτήματα που αφορούν την έλλειψη μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων που αποτελεί απαραίτητη διαδικασία για την σωστή ανάδιπλωση, την λειτουργικότητα και την σταθερότητα των πρωτεϊνών .

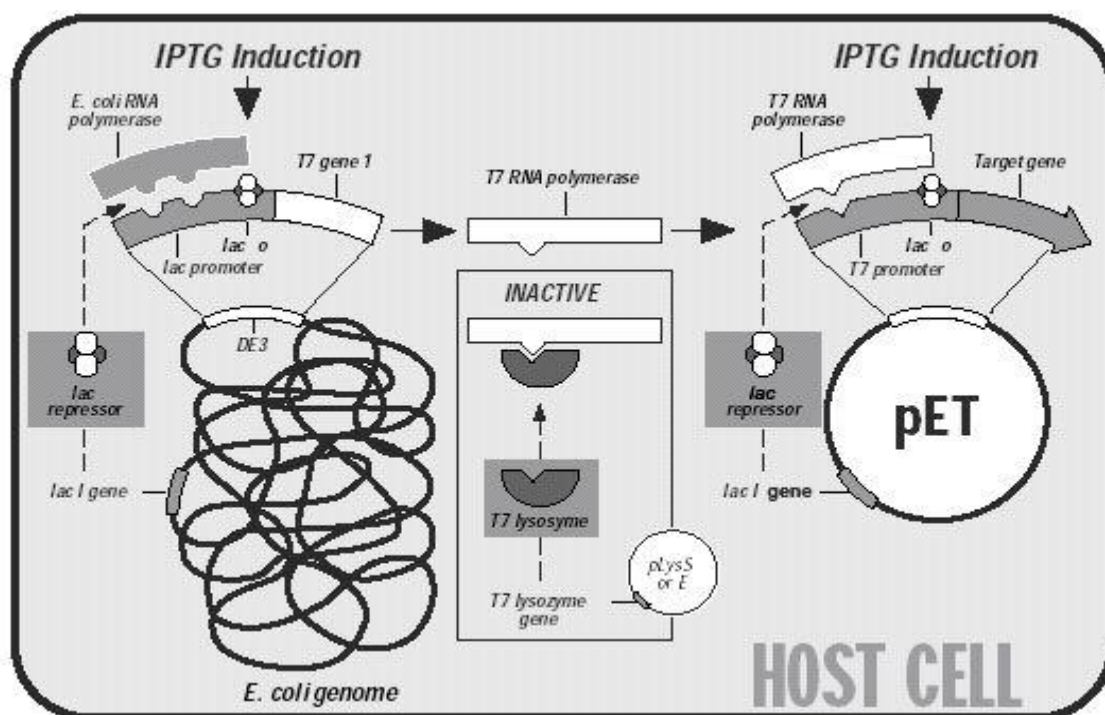
Τα συστήματα έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα εξής:

- pET (Novagen)
- p QE (Qiagen)

9.1 Σύστημα έκφρασης pET

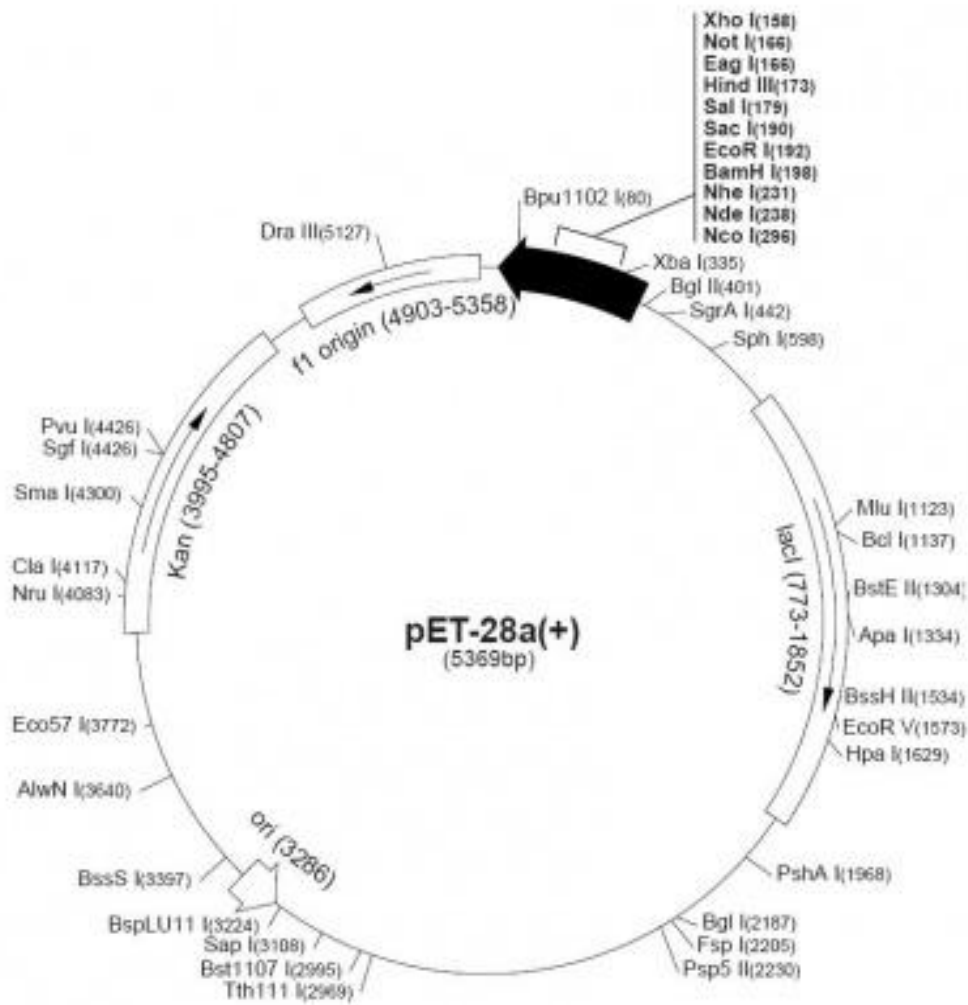
Το σύστημα έκφρασης pET περιγράφηκε αρχικά από τους Studier *et al.*, 1990). Βασίζεται στο γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία δεν αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση του *E. coli*. Η έκφραση προϋποθέτει στα βακτηριακά κύτταρα έκφρασης να υπάρχει T7 RNA πολυμεράση.

Στα BL21 κύτταρα έκφρασης, υπάρχει η T7 RNA πολυμεράση, υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *lacUV*, ο οποίος επάγεται από το IPTG. Το *lacI* καταστέλλει τόσο τον *lacUV* προαγωγέα, όσο και το T7/ *lac* υβρίδιο-προαγωγές που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο. Ένα αντίγραφο του *lacI* γονιδίου βρίσκεται και στο βακτηριακό γένωμα του *E. coli* και στο πλασμίδιο pET. Η T7 RNA πολυμεράση μεταγράφεται όταν το IPTG προσδένεται και προκαλεί την απελευθέρωση του τετραμερούς *lac I* από το χειριστή *lac*. Η μεταγραφή του γονιδίου- στόχου από τον T7/ *lac* προαγωγέα ξεκινά με τη δράση της T7 RNA πολυμεράσης.



Εικ. 13: Σύστημα έκφρασης pET

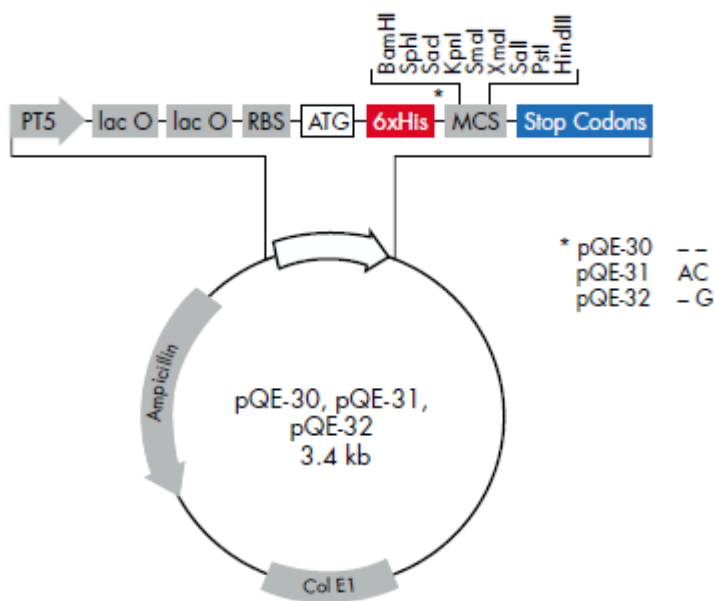
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pET 28a, ο οποίος έχει μέγεθος 5369bp και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Επίσης στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό του άκρο φέρει ακολουθία His-Tag. Αρχικά τα ανασυνδυνασμένα με το επιθυμητό γονίδιο, πλασμίδια μετασχηματίζουν τα κύτταρα DH5a, τα οποία δεν έχουν την δυνατότητα έκφρασης. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία καναμυκίνης και στη συνέχεια μεταφέρονται στα κύτταρα έκφρασης BL21. Και αυτά επιλέγονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία καναμυκίνης.



Εικ.14: Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a.

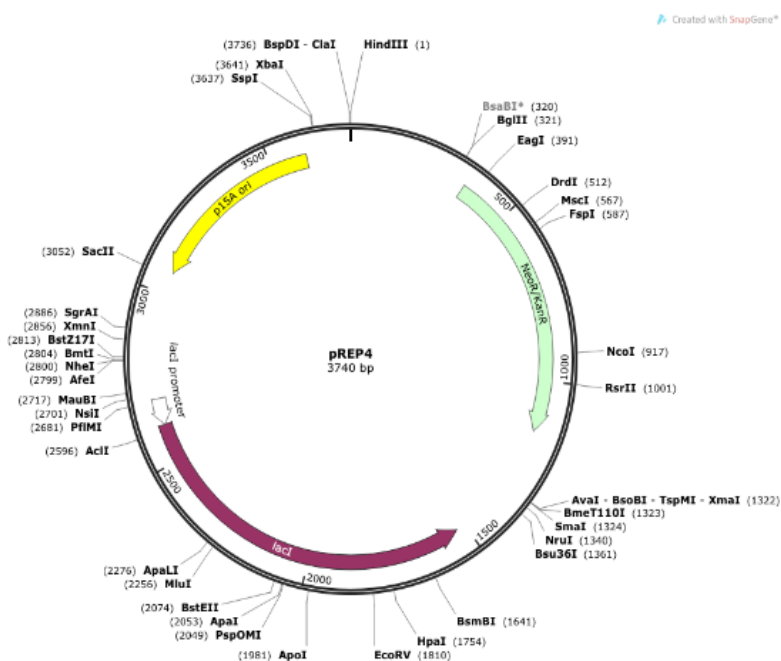
9.2 Σύστημα έκφρασης pQE

Το σύστημα έκφρασης pQE βασίζεται στον προαγωγέα *lac*/ T5. Τα πλασμίδια pQE διαθέτουν τον προαγωγέα T5, ο οποίος αναγνωρίζεται από την RNAπολυμεράση του *E. coli*. Επιπλέον περιλαμβάνουν δύο χειριστές *lac*, οι οποίοι αυξάνουν την πρόσδεση του *lac* καταστολέα και εξασφαλίζουν την αποτελεσματική καταστολή του ισχυρού προαγωγέα T5. Η εξαιρετικά υψηλή έκφραση που προάγεται από τον T5 προαγωγέα, μπορεί να ρυθμιστεί και να κατασταλεί, μόνο από την παρουσία υψηλής ποσότητας *lac* καταστολέα.



Εικ.15: Ο πλασμιδιακός φορέας pQE 30-32.

Στα M15 κύτταρα έκφρασης περιέχεται το πλασμίδιο pREP4, το οποίο εκφράζει συνεχώς την πρωτεΐνη καταστολέα- *lac*, που κωδικοποιείται από το *lacI* γονίδιο. Η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG, το οποίο προσδένεται στην πρωτεΐνη καταστολέα και την απενεργοποιεί.



Εικ.16: Το πλασμίδιο pREP4.

Με τον τρόπο αυτό η RNA πολυμεράση δύναται να μεταγράψει τις ακολουθίες κατωφερικά του T5 προαγωγέα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pQE30, ο οποίος έχει μέγεθος 3461bp και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικίνη. Επίσης περιέχει και την ακολουθία His- tag. Τα ανασυνδυασμένα με το επιθυμητό γονίδιο πλασμίδια μετασηματίζουν αρχικά τα κύτταρα

XL1 BLUE, στα οποία παράγεται μεγάλη ποσότητα lac καταστολέα. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία αμπικιλίνης. Παρά το γεγονός ότι πραγματοποιήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης στα XL1 BLUE κύτταρα, μεταφέρθηκαν και στα M15 τα οποία περιέχουν το πλασμίδιο pREP-4 που έχει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Τα τελευταία επιλέγονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία καναμυκίνης και αμπικιλίνης.

9.3 Επαγωγή της έκφρασης

- Ανάπτυξη των θετικών αποικιών κυττάρων έκφρασης σε θρεπτικό μέσο LB (5μl) υπό την παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, στους 37°C ο/ν.
Μετασχηματισμένα BL21 χρειάζονται καναμυκίνη (50mg/ml), XL1 BLUE χρειάζονται αμπικιλίνη (100mg/ml), M15-pREP4 χρειάζονται καναμυκίνη (25μg/ml) και αμπικιλίνη (100μg/ml).
- Στη συνέχεια γίνεται ανακαλλιέργεια 1/100, οπότε μικρή ποσότητα αυτών (50μl) μόλυναν νέα υγρή καλλιέργεια (10ml) με αντιβιοτικά και αναπτύσσονται στους 37°C έως ότου οι βακτηριακές καλλιέργειες αποκτήσουν οπτική πυκνότητα O.D.= 0.5
- Ακολουθεί προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, με σκοπό την επαγωγή του συστήματος έκφρασης. Η επαγωγή διαρκεί έως 6ώρες. Δείγματα λαμβάνονται σε διάφορες χρονικές στιγμές (1ml καλλιέργειας), φυγοκεντρώνονται και φυλάσσονται στους -20°C.
- Από κάθε καλλιέργεια διατηρούνται τα εξής δείγματα:

Total στο οποίο βρίσκονται όλες οι πρωτεΐνες

Μετά από sonication (διαδικασία κατά την οποία μέσω υπερήχων σπάνε τα βακτηριακά κύτταρα, ενώ οι πρωτεΐνες μένουν άθικτες)

Pellet (ίζημα) και Supernatant (υπερκείμενο)

- Το δείγμα στο οποίο βρίσκεται το ίζημα αρχικά επαναδιαλύεται σε 250μl Sonication buffer
- Μέσω υπερήχων (sonication), το οποίο διαρκεί 10min, σπάνε τα βακτηριακά κύτταρα
- Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 10min στους 4C°
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf

Sonication buffer

20mM Tris HCL, pH 8, 2.5mM EDTA, 5mM
imidazole, 10% glycerol, 150mM KCL

10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

10.1 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE, SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους όπως το western blotting.

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης είναι χημικά αδρανείς και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με το αντιδραστήριο N,N'-methylenebisacrylamide. Η συνήθης αναλογία ακρυλαμίδης : bis- acrylamide είναι 29:1 και καθιστά εφικτό τον διαχωρισμό πολυπεπτιδίων που τα μοριακά τους βάρη διαφέρουν μέχρι 3%. Η διάμετρος των πόρων του πηκτώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης.

Για την έναρξη του πολυμερισμού της πολυακρυλαμίδης είναι απαραίτητη η παρουσία των αντιδραστηρίων Ammonium persulfate (APS) και Tetramethyl ethylenediamine (TEMED), το πρώτο από τα οποία δρα ως δότης ελευθέρων ριζών, ενώ το δεύτερο δρα καταλυτικά ως συλλέκτης αυτών.

Το μίγμα (ακρυλαμίδης, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπια και οι πηκτές μπορούν να είναι είτε κυλινδρικές (μέσα σε κυλινδρικούς γυάλινους σωλήνες) ή επίπεδες (ανάμεσα σε 2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους) ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές (wells) στο πάνω μέρος της πηκτής.

Γενικά, στην PAGE οι πηκτές μπορούν να κατασκευαστούν με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer (continuous buffer systems) ή με τη δημιουργία ενός 'συγκεντρωτικού' gel (stacking gel) ακριβώς πάνω από το 'αναλυτικό' gel (resolving gel) (discontinuous buffer systems). Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς

μεγαλύτερους πόρους από το resolving (ή separation ή running) gel, στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Οι δυο αυτοί παράμετροι, δηλαδή η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο. Αντίθετα, τα συστήματα με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιβάλλουν τη συγκέντρωση του δείγματος σε πολύ μικρό όγκο.

Προετοιμασία του δείγματος

Η προετοιμασία του δείγματος είναι πολύ σημαντική και από μόνη της μπορεί να κρίνει την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης. Στα προς ανάλυση δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση προστίθεται Laemmli buffer, το οποίο περιέχει:

- SDS – εκτός από τα ήδη προαναφερθέντα, η χρήση του εκμηδενίζει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και την δημιουργία συμπλόκων.
- Γλυκερόλη – είναι παχύρρευστο υγρό και βοηθάει το δείγμα να βυθιστεί στον πάτο της οπής του gel.
- Tris– είναι μια οργανική ουσία και προσδίδει το κατάλληλο pH (6,8) για τη διατήρηση των πρωτεϊνών.
- Dithiothreitol (DTT) ή 2-mercaptoethanol – είναι αναγωγικές ουσίες και διασπάνε τους δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις κυστεΐνες των πρωτεϊνών και συμβάλουν στην πλήρη μετουσίωσή τους.
- μπλε βρωμοφαινόλη – είναι χρωστική με αρνητικά φορτισμένα μόρια (άρα θα μετακινηθεί προς την άνοδο) και χρησιμοποιείται ως ένδειξη για την πορεία της ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια το δείγμα θερμαίνεται στους 80°C για 10 λεπτά, ώστε το SDS να δεθεί με τις πρωτεΐνες και να δράσει η αναγωγική ουσία, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο όλες τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Παρακάτω παρουσιάζεται η σύσταση του πήκτωματος της πολυακρυλαμίδης:

Resolving gel (10 %)		
<i>Συστατικά</i>	<i>Αρχική συγκέντρωση</i>	<i>Ποσότητα (5ml / gel)</i>
ddH ₂ O	-	1.9 ml
Acrylamide mix	30% w/ v	1.7 ml
Tris-HCl (p H 8.8)	1.5 M	1.3 ml
SDS electrophoresis grade	10% w/ v	0.05 ml
APS	10% w/ v	0.05 ml
TEMED		0.002 ml

Stacking gel (5 %)		
<i>Συστατικά</i>	<i>Αρχική συγκέντρωση</i>	<i>Ποσότητα (5ml / gel)</i>
ddH ₂ O	-	2.1 ml
Acrylamide mix	30% w/ v	0.5 ml
Tris-HCl (p H 6.8)	1 M	0.38 ml
SDS electrophoresis grade	10% w/ v	0.03 ml
APS	10% w/ v	0.03 ml
TEMED		0.003 ml

Αφού παρασκευαστεί το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και εισάγεται και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Κατόπιν εφαρμόζονται τα πρωτεϊνικά δείγματα στις κατάλληλες θέσεις- ‘πηγαδάκια’ και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό στα 25m A και 200V. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα χρησιμοποιείται είτε για χρώση είτε για μεταφορά πρωτεϊνών σε κατάλληλη μεμβράνη.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

1x Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris- glycine running buffer):

25m M Tris, 250m M Glycine (electrophoresis grade p H 8.3), 0.1% w/v SDS

2x loading buffer:

100m M Tris- HCl p H 6.8, 5% w/v SDS (electrophoresis grade), 0.02% w/v bromophenol blue, 20% v/v glycerol, 1% b- mercaptoethanol, dd H₂O

10.2 Χρώση των πρωτεϊνών

Η χρώση των διαχωρισμένων, σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, πρωτεϊνών, πραγματοποιείται είτε με άλατα αργύρου είτε με Coomassie Brilliant Blue. Η τελευταία προσδένεται μη-ειδικά στις πρωτεΐνες αλλά όχι στο πήκτωμα επιτρέποντας την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών ως μπλε ζώνες στο αποχρωματισμένο πήκτωμα. Η Coomassie Brilliant Blue πρόκειται για μια αμινοτριαρυλ-μεθανοχρωστική, η οποία συγκρατείται στις πρωτεϊνικές δομές λόγω Van der Waals δυνάμεων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις αμινομάδες αυτών. Η πρόσδεση της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η Coomassie Brilliant BlueR-250.

- Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μεταφέρεται σε διάλυμα χρώσης (staining solution), όπου ανακινείται ελαφρά για 20-30min.
- Στη συνέχεια το πήκτωμα ξεπλένεται με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) όσες φορές χρειάζεται, εως ότου αποχρωματιστεί το πήκτωμα και εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.
- Το πήκτωμα φωτογραφίζεται και κατόπιν φυλάσσεται σε τριβλίο με νερό.

Διαλύματα χρώσης και αποχρωματισμού πρωτεϊνών

Διάλυμα χρώσης (Staining solution)

40% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικόοξύ, 0,1% w/v Coomassie Blue R-250, H₂O

Διάλυμα απόχρωσης (Destaining solution)

10% v/v μεθανόλη, 5% v/v οξικόοξύ, H₂O

10.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Η ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση και εκτίμηση του μεγέθους των μακρομοριακών αντιγόνων (συνήθως πρωτεΐνες) που αντιδρούν με κάποιο αντίσωμα. Περιλαμβάνει την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια την μεταφορά τους, ηλεκτροφορητικά, σε κάποια μεμβράνη. Ακολούθως οι ελεύθερες περιοχές της μεμβράνης πληρούνται με παρεμποδιστικό μέσο (σκόνη γάλακτος 5% w/v ή BSA- Bovine Serum

Albumin 1% w/v), με σκοπό την ελαχιστοποίηση των μη εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεμβράνης και αντισώματος. Κατόπιν οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες αντιδρούν με εξειδικευμένα αντισώματα. Τα σύμπλοκα αντιγόνου- αντισώματος τελικά εντοπίζονται μέσω δευτερογενών αντισωμάτων, τα οποία μπορούν να εντοπιστούν μέσω αντιδράσεων ραδιογραφίας, χρωματικών ή χημειοφωταύγειας.

10.4 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Western transfer)

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη πραγματοποιείται ηλεκτροφορητικά και σκοπό έχει την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών σε στερεό μέσο. Η κίνηση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη γίνεται κάθετα με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού στα άκρα της συσκευής. Υπάρχουν τρεις τύποι μεμβρανών:

- Νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose)
- Νάιλον και θετικά φορτισμένες νάιλον μεμβράνες
- Polyvinylidene fluoride (PVDF)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε PVDF μεμβράνη και η συσκευή Trans- Blot Semi- Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD).

Polyvinylidene fluoride (PVDF): Οι πρωτεΐνες προσδένονται σε αυτές τις μεμβράνες μέσω ισχυρών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η χωρητικότητα των PVDF μεμβρανών είναι περίπου 170μg/ cm². Οι μεμβράνες αυτές συγκρατούν τις πρωτεΐνες έξι φορές ισχυρότερα συγκριτικά με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Επιπλέον οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες μπορούν να οπτικοποιηθούν με τη χρήση διαφόρων χρωστικών, όπως PonceauS, Coomassie Brilliant Blue και άλλες.

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- Κόβονται έξι διηθητικά χαρτιά Whatmann και ένα κομμάτι μεμβράνης PVDF, στις διαστάσεις του πηκτώματος
- Το πήκτωμα μεταφέρεται σε τριβλίο με Transfer buffer (1x), όπου επίσης εκεί εμβαπτίζονται και τα διηθητικά χαρτιά Whatmann.
- Η μεμβράνη διαβρέχεται σε 100% μεθανόλη για λίγα δευτερόλεπτα για να ενεργοποιηθεί
- Στη συνέχεια μεταφέρεται και η μεμβράνη στο Transfer buffer
- Τοποθετούνται τα διηθητικά χαρτιά, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και η μεμβράνη, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Ρυθμίζεται το τροφοδοτικό στα 200mA και 10V για 35min.

Κατόπιν η μεμβράνη διαχωρίζεται από τα διηθητικά χαρτιά και το πήκτωμα και ξεπλένεται με διάλυμα TBST.

Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών

10x transfer buffer

480m M Tris, 390m M glycine, 0.375% SDS

*Στο 1x προσθήκη 20% v/v μεθανόλης

10.5 Αλληλεπίδραση μεμβράνης με εξειδικευμένα αντισώματα

Για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται αντισώματα πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν περισσότερα από ένα επιτόπια, ενώ τα μονοκλωνικά μόνο ένα.

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά το χειρισμό της μεμβράνης με κάποιο παρεμποδιστικό μέσο (5% w/v σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος) και στη συνέχεια την εφαρμογή δύο αντισωμάτων. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι εξειδικευμένο για την πρωτεΐνη- στόχο, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα είναι εξειδικευμένο για το πρωτογενές αντίσωμα και είναι συζευγμένο με κατάλληλο αντιδραστήριο, το οποίο δύναται εύκολα να εντοπιστεί.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

- Ξεπλένεται η μεμβράνη με διάλυμα TBST
- Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα blockingbuffer (TBST με 5% w/v σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος) για 1h όπου ανακινείται ελαφρά
- Αφαιρείται το blocking buffer και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα, 1/1000 Mouse Anti-polyhistidine Ταq monoclonal antibody (Chemicon), και αφήνεται O/N στους 4 ή σε ελαφριά ανάδευση για 1- 1 ½ h
- Ακολούθως η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBST (3φορές x 10min)
- Προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, 1/3000 goat Anti-Mouse IgG-HRP (Santacruz biotechnology), και αφήνεται για 45min.
- Ακολούθως η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBST (3 φορές x 10min)
- Το Blocking buffer καθώς και τα αντισώματα επαναχρησιμοποιούνται και φυλάσσονται στους -20°C.

Διαλύματα αλληλεπίδρασης μεμβράνης – εξειδικευμένων αντισωμάτων

- **Διάλυμα TBS (1x)**

10mM Tris- HCl pH 8.0, 150mM NaCl

- **Διάλυμα TBST**

10m M Tris- HCl p H 8.0, 150m M NaCl, 0.1% v/v Tween 20

- **Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος**

1/ 1000 πρωτογενές αντίσωμα σε TBS + 5% w/v σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος

- **Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος**

1/ 3000 δευτερογενές αντίσωμα σε TBS + 5% w/v σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος

Τα αντισώματα επαναχρησιμοποιούνται και φυλάσσονται στους -20°C.

10.6 Ανίχνευση σήματος

Η ανίχνευση συνίσταται στον εντοπισμό του δευτερογενούς αντισώματος μέσω της διεξαγωγής κάποιας αντίδρασης χημειοφωταύγειας.

Η υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia rusticana* (horseradish), HRP, είναι μια πρωτεΐνη που έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει σε αντιδράσεις χημειοφωταύγειας. Η χημειοφωταύγεια είναι η εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας, ως αποτέλεσμα της μετάβασης συγκεκριμένων διεγερμένων χημικών ουσιών στη βασική τους κατάσταση. Η ανίχνευση μέσω αντιδράσεων χημειοφωταύγειας είναι αρκετά ευαίσθητη, γρήγορη και εφαρμόσιμη, τόσο σε διαλύματα όσο και σε μεμβράνες.

Η HRP, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, προκαλεί μια κυκλική αντίδραση χημειοφωταύγειας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση του luminol σε μια διεγερμένη μορφή (3-aminophthalate). Καθώς το ενδιάμεσο αυτό συστατικό επιστρέφει στη βασική του κατάσταση εκπέμπει μπλε ακτινοβολία στα 428nm, η οποία μπορεί εύκολα να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ.

Για την ανίχνευση της δράσης της HRP στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο LumiSensor HRP SubstrateKit. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Αναμειγνύονται ίσες ποσότητες των διαλυμάτων A και B (1000μl από το καθένα)
- Αφαιρείται το διάλυμα TBST από την μεμβράνη και προστίθεται το διάλυμα luminol στη μεμβράνη. Ακολουθεί επώαση στο luminol για 1min
- Αφαιρείται το διάλυμα luminol και η μεμβράνη προορίζεται για αυτοραδιογραφία

Η μεμβράνη αρχικά τοποθετείται σε μεταλλική κασέτα έκθεσης με φιλμ KodakX. Η έκθεση διαρκεί συνήθως μερικά λεπτά. Η εμφάνιση του φιλμ γίνεται με εμβάπτιση του για 2-5min σε διάλυμα εμφάνισης Developer, ακολούθως σε νερό βρύσης και τελικά σε μονιμοποιητικό διάλυμα Fixer. Τέλος ξεπλένεται σε νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε προηγούμενη μελέτη, για την απομόνωση του γονιδίου ακολουθήθηκε η τεχνική του εκφυλισμένου PCR, με τον σχεδιασμό εκφυλισμένων εκκινητών από συντηρημένες περιοχές μελών της υποοικογένειας CYP71A, η οποία απέδωσε ένα κεντρικό τμήμα 573 βάσεων, το οποίο αντιστοιχεί σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 191 αμινοξέων. Από το τμήμα αυτό σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για την στόχευση του 5' άκρου του γονιδίου, με την τεχνική του 5'RACE-PCR. Οι αντιδράσεις του 5' RACE παρήγαγαν ένα τμήμα 510 βάσεων, που αντιστοιχεί σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 149 αμινοξέων. Το τμήμα αυτό εμφανίζει επίσης συντηρημένες περιοχές των κυτοχρωμάτων που εντοπίζονται στο άμινο-άκρο των ενζύμων, ενώ στα 25 αμινοξέα της περιοχής επικάλυψης με το κεντρικό τμήμα εμφανίζει πλήρη ομολογία.

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την σύνθεση ολόκληρου του *CYP 71A* γονιδίου, με την εύρεση της αλληλουχίας του 3' άκρου με την χρήση της μεθόδου 3'RACE-PCR και στη συνέχεια η παραγωγή και η απομόνωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης CYP 71A- *Olea*.

1. ΦΥΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Η απομόνωση RNA έγινε από νεαρά φύλλα ελιάς ποικιλίας "Κορωνέϊκη". Μετά την συλλογή, την ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με υγρό άζωτο και την απομόνωση του ολικού RNA, μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά η συγκέντρωση του δείγματος σε αραιώση 1/100. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Δείγμα RNA	O.D. 260	O.D. 280	O.D.260/ O.D.280	C (μg/ ml)
1/100	0.178	0.096	1.85	712

Ακολούθησε χειρισμός με DNάση και εκ νέου υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA στα 200μg/ml.

Αντίδραση DNase (young leaves)	
RNA (10mg)	14μl
DNase I Reaction Buffer (10x)	8 μl
DNase I (RNase-free) (2U/μl)	2,5 μl
RNaseOUT (40U/μl)	1 μl
H ₂ O	54,5 μl
Total	80 μl

	Πριν την DNase	Μετά την DNase
Concentration	712μg/ml	200 μg/ml
Total	14,24 μg	3,4 μg
260/280	1,85	1,51
Recovery		34%

Στη συνέχεια έγινε ανάστροφη μεταγραφή 1,5 μg ολικού RNA, με χρήση του dT17Xho I εκκινητή, σε αντίδραση όγκου 20μl (*Υλικά και μέθοδοι*). Το προϊόν της αντίδρασης RT αραιώθηκε 1/5. Το μονόκλωνο cDNA χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω ως μήτρα για τις αντιδράσεις του 3'RACE-PCR.

Αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (RT)

1 st step	
RNA (1,5μg)	8 μl
Primer oligo- dT 17 (25μM)	3 μl
dNTPs (10mM)	1 μl

5' στους 65°C

2st step

5X First-Strand Buffer	4 μl
DTT (0,1M)	2 μl
RNaseOUT (40U/μl)	1 μl
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT) (200U/μl)	1 μl
total	20 μl

1h στους 42°C
15' στους 70°C

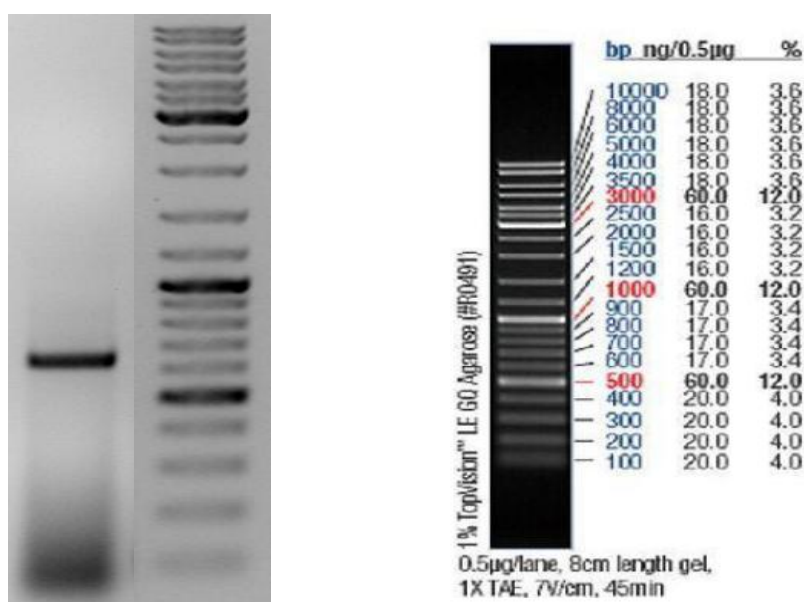
Για να ελεγχθεί η ποιότητα του cDNA πραγματοποιήθηκε ένα δοκιμαστικό PCR για το γονίδιο της ακτίνης με τη χρήση της πολυμεράσης **DreamTaq DNA Polymerase, Thermo Scientific**, με εκκινητές τους Forward Actin και Reverse Actin των οποίων οι ακολουθίες και τα Tm αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Επίσης αναφέρεται το πρόγραμμα της αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο της ακτίνης καθώς επίσης και η εικόνα ηλεκτροφόρησης.

<u>Εκκινητής</u>	<u>Αλληλουχία</u>	<u>Tm</u>
Forward Actin	5'-AAGATGACCCAAATCATGTTTGAGAC-3'	60,47 ⁰ C
Reverse Actin	5'-ACGACCTTGATCTTCATGCTGC-3'	60,76 ⁰ C

PCR Actin program	
1.	94 °C για 2:00
2.	94 °C για 0:30
3.	57 °C για 0:30
4.	72 °C για 1:00
5.	Go to step 2, 34 times
6.	72 °C για 7:00
7.	12°C hold

<i>Συστατικά Αντίδρασης Actin gene</i>	<i>Συνολικός όγκος αντίδρασης: 25μl</i>
(10x) DreamTaq Buffer	2,5 μl
dNTP Mix, 2 mM each	2,5 μl
Forward Actin Primer	2,5 μl
Reverse Actin Primer :	2,5 μl
Template DNA	2 μl
DreamTaq DNA Polymerase (500U)	0,2 μl
H ₂ O	12,8 μl

Εικ. 17: Ανάλυση από το προϊόν της αντίδρασης PCR του γονιδίου της ακτίνης σε πηκτή αгарόζης 1% .Στη δεύτερη στήλη ο δείκτης μοριακών βαρών Gene Ruler DNA Ladder Mix.



2. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ 3' ΑΚΡΟΥ ΤΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ 3'RACE-PCR

Από το κεντρικό τμήμα καθώς και από το τμήμα που απομονώθηκε μέσω του 5RACE-PCR, σχεδιάστηκαν ορθοί εκκινητές, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

```
TTTTGGCTGAATGTCTGCCTAATTAATAGTAGAGCATCCTATGAATTCTGTGTTTAAAAGAAA
ATGATTTCTTTTTCACATCTGATAGTTCCTCTTGTTTCCTTAATTTG TTCATCGTTTTTCCTC
TTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCGGAAAAGATTGCCACCATCTCCACCA
AAGCTTCCCATAATTGGAAATCTTCACCAACTCGGCCAACTCCCCCATCGCTCACTGCAA
GCACTATCCAAATGCTACGGTCCGCTCATGTTGCTTCATTTGGGCAGATTGCCAGTACTTG
TTGTCTCCTCTGCTGATGGTGCCACGAAATCATGAAAAATCAGGACGTGGTTTTTCTCAA
ACAGGCCGAAATTGAGAGTTATCGACAAAATTATATATGGCTCTAAGGACATGGCTTTTGC
TCCATATGGTGAGTACTGGAGGCA GGTGAGAAGTATATGTGTGCTTCAGCTTTTGAGTAAT
AAGAGGGTTCAATCCTTTTCGTCCATATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGT
GTGCTTCAGCTTTTGTAGTAATAAGAGGGTTCAATCCTTTTCGTTCGTGTAAGAGAAGAAGAA
ATGTCCCTTATGATTGAGAAAATTAGACATCTTCTTCATCTTCAATAAA CTTGAGCAATAT
ATTGGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAATATATTGCTG
CACAAGAAAGCACAAAAATTGTGTCAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTACTAGTTACT
TTAATCCAGGGGATTACATTCATGGCTTGACTGGATTAATCGCGTTAATGATTTCAATGC
AAATGTTGAGAAAATGGCTAGATGGTTTGATGATTTTTTTCGAAGGTGTAGTTGAAGAGCA
CAGAAATCGAAAAAAAAGAGAGACAAACCTCAA GACAGCAGCAATGAAGCAGATCTT
GTGGACATATTGATCGAAATTCAGAGAGAAAACATGGCTGGTTCCCTATAGAAAATGAT
ACAATCAAAGCTGTCATTTTTGATATTTTTGTGGCTGGAACCGACACAAT
```

Εικ. 18: Οι ακολουθίες και η φορά των εξειδικευμένων εκκινητών που σχεδιάστηκαν για το 3'RACE-PCR. Σε κόκκινο πλαίσιο παρουσιάζονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν από το 5' άκρο, και στο πράσινο πλαίσιο οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν από το κεντρικό τμήμα του γονιδίου. Με έντονη και υπογραμμισμένη γραμματοσειρά επισημαίνεται το κωδικόνιο έναρξης (ATG) που αντιστοιχεί στο αμινοξύ μεθειονίνη. Τα ονόματα, οι ακολουθίες, τα Tm των εκκινητών και το αναμενόμενο μέγεθος του παραγόμενου τμήματος δίνονται στον παρακάτω πίνακα. Η εκτίμηση του αναμενόμενου μεγέθους του

παραγόμενου τμήματος υπολογίστηκε με βάση το μέγεθος των αντίστοιχων ομόλογων γονιδίων που προέκυψαν από την εισαγωγή της ακολουθίας στο πρόγραμμα blastx.

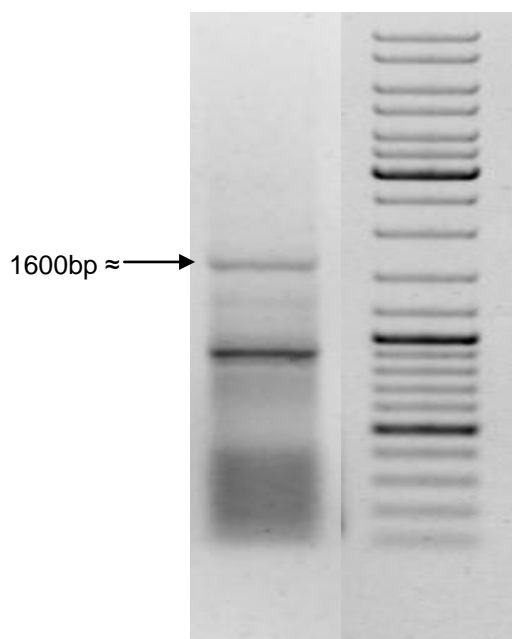
Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm	Αναμενόμενο μέγεθος (bp)
5FK1	5' TTCATC GTTTTC CTCTTC AAATGG TATGG 3'	62.8°C	~1500 bp
5FK2	5' GGT GAG AAG TAT ATGTGT GCT TCA G 3'	61.8°C	~1200 bp
CFK1	5' CTT GAG CAA TAT ATT GGT GTC ACT 3'	58°C	~1000 bp
CFK2	5' GAC AGC AGC AAT GAA GCA GAT C 3'	60,76°C	~ 900-1000 bp
dT17XhoI	5' GTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	58,5°C	

2.1 Αντιδράσεις 3' RACE-PCR

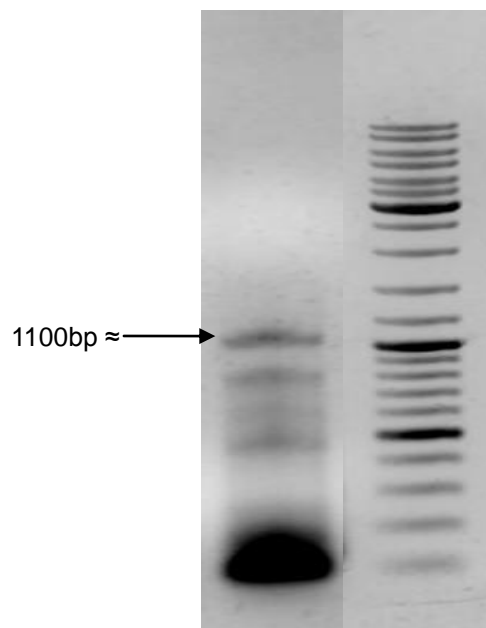
Για τις αντιδράσεις του 3'RACE-PCR χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα 2μl cDNA από την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής, μετά από αραιώση 1/5 του δείγματος. Στις αντιδράσεις για την ενίσχυση των άκρων των νουκλεοτιδικών ακολουθιών είναι κοινή πρακτική η χρησιμοποίηση εσωτερικών του αρχικού εκκινητών για αύξηση της εξειδίκευσης και της απόδοσης του πολυμερισμού. Για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκε ο 5FK2 εκκινητής εσωτερικά του 5FK1, και ο CFK2 εκκινητής εσωτερικά του CFK1.

- Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με την χρήση των εξωτερικών εκκινητών 5FK1 και CFK1 και με μήτρα 2μl cDNA από την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής. Δοκιμάστηκαν διάφορες θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών (56°C, 58°C, 60°C, 62°C) καθώς επίσης και δύο διαφορετικά προγράμματα αντιδράσεων. Τα επιθυμητά αποτελέσματα πάρθηκαν ακολουθώντας το παρακάτω πρόγραμμα.

Το πρόγραμμα PCR που πραγματοποιήθηκε με εκκινήτες: 5FK1-dT17XhoI και CFK1-dT17XhoI	
1).	94 °C for 2:00
2).	94 °C for 0:30
3).	60 °C for 0:30
4).	72 °C for 1:00
5).	Go to step 2, 44 times
6).	72 °C for 10:00
7).	12°C hold



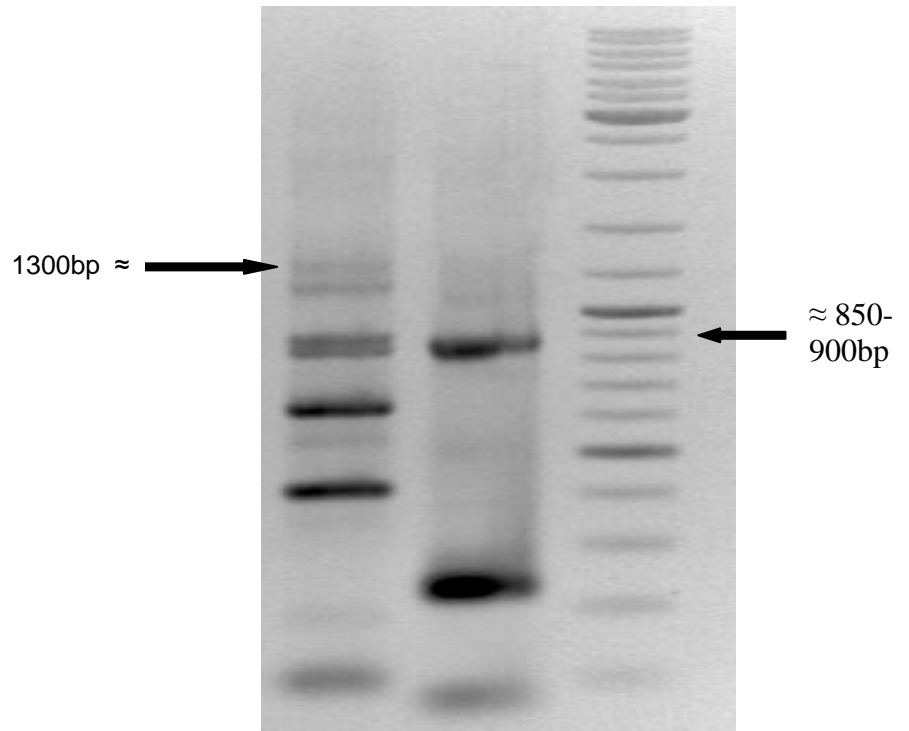
Εικ. 19: Ανάλυση 8μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR με εκκινήτες *5FK1-dT17XhoI* σε πηκτική αγαρόζης 1%. Στη δεύτερη στήλη ο δείκτης μοριακών βαρών Gene Ruler DNA Ladder Mix.



Εικ. 20: Ανάλυση 8μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR με εκκινήτες *CFK1-dT17XhoI* σε πηκτική αγαρόζης 1%. Στη δεύτερη στήλη ο δείκτης μοριακών βαρών Gene Ruler DNA Ladder Mix.

- Στη συνέχεια έγινε αραίωση 1/1000 των προϊόντων των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν αρχικά με εκκινητές τους 5FK1- dT17XhoI και CFK1-dT17XhoI και με μήτρα 2μl cDNA από την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής.

Το πρόγραμμα PCR που πραγματοποιήθηκε με εκκινητές: 5FK2-dT17XhoI και CFK2- dT17XhoI.	
1).	94 °C for 2:00
2).	94 °C for 0:30
3).	58 °C for 0:30
4).	72 °C for 1:00
5).	Go to step 2, 44 times
6).	72 °C for 10:00
7).	12 ⁰ C hold

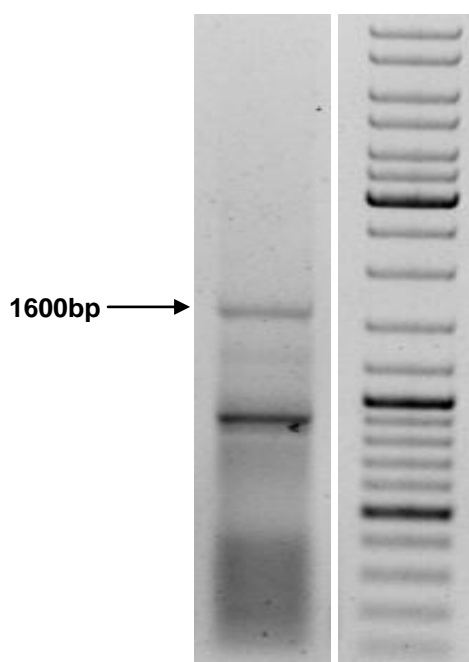


Εικ. 21: Στη πρώτη στήλη το προϊόν της αντίδρασης με εκκινητές 5FK2-dT17XhoI, στη δεύτερη στήλη το προϊόν της αντίδρασης με εκκινητές CFK2-dT17XhoI και στη τρίτη στήλη ο δείκτης μοριακών βαρών Gene Ruler DNA Ladder Mix.

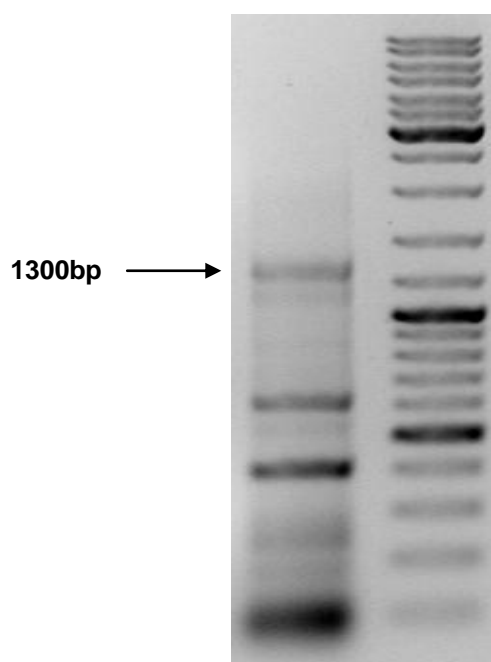
Οι αραιώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για τις επόμενες αντιδράσεις PCR που έγιναν χρησιμοποιώντας τους εσωτερικούς εκκινητές 5FK2 και CFK2 και σε θερμοκρασία υβριδισμού 58.

Διαπιστώνεται ότι σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε με τον κάθε ένα από τους ορθούς εξειδικευμένους εκκινητές, σε συνδυασμό με τον dT17XhoI, παρατηρείται η αντίστοιχη ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος. Επίσης είναι εμφανείς και άλλες μη- επιθυμητές ζώνες και πιθανώς αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα P450 γονίδια συγκαταλέγονται σε μια μεγάλη οικογένεια γονιδίων με αρκετές συντηρημένες περιοχές και επιπλέον ως μήτρα έχει χρησιμοποιηθεί cDNA από την αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής με αποτέλεσμα οι εκκινητές να βρίσκουν παρόμοιες θέσεις και να υβριδίζουν σε αυτές.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:



Εικ. 22: Το προϊόν της αντίδρασης PCR με εκκινητές *5FK1- dT17XhoI* και μήτρα 2μl cDNA από την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής.

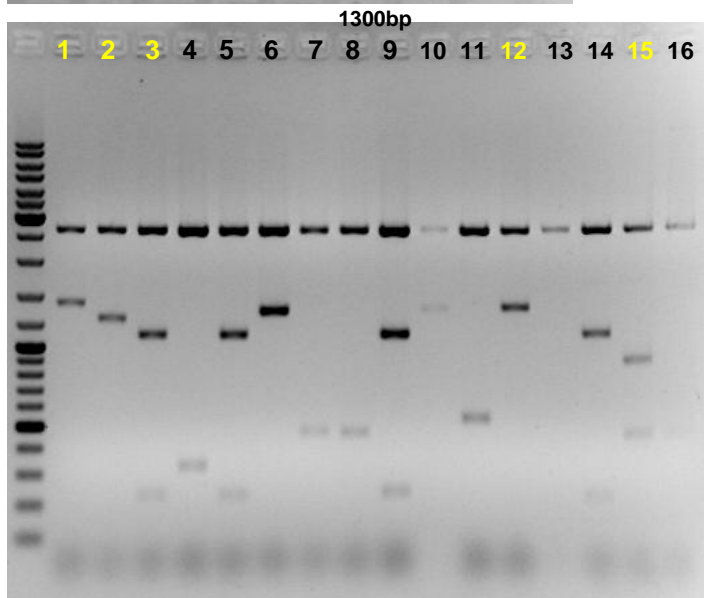


Εικ. 23: Το προϊόν της αντίδρασης PCR με εκκινητές *5FK2- dT17XhoI* και μήτρα 2μl cDNA από την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής.

- ▲ Από τις παραπάνω αντιδράσεις PCR, επιλέχθηκαν οι ζώνες που επισημαίνονται με βέλος στις εικόνες 22 και 23, και ακολούθησε απομόνωση από την πηκτή αγαρόζης και καθαρισμός της κάθε μία μπάντας με την χρήση του Nucleospin Gel and PCR Clean-up, Macherey nagel.
- ▲ Ενσωμάτωση σε πλασμιακό φορέα (pUC 19) στη θέση περιορισμού *SmaI* με την χρήση του ενζύμου T4 DNA ligase, 5U/μl.
- ▲ Μετασχηματισμός και κλωνοποίηση δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a, *E. coli*
- ▲ Απομόνωση πλασμιδίου από τα μετασχηματισμένα κύτταρα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.
- ▲ Πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII* για να επιβεβαιωθεί ότι έχει γίνει σωστά η ένθεση στο πλασμίδιο.
- ▲ Μετά από τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII*, επιλέχθηκαν δύο δείγματα που αντιστοιχούσαν στη μπάντα των 1600bp (εκκινητές *5FK1- dT17XhoI*) και πέντε δείγματα που αντιστοιχούσαν στη ζώνη των 1300bp (εκκινητές *5FK2- dT17XhoI*) και στάλθηκαν για αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών.



Εικ. 24: Ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου p UC19 με την ένθεση 1600bp μετά από την πέψη με τις ενδονουκλεάσες EcoRI και Hind III. Επιλέχθηκαν τα δύο πρώτα δείγματα, η μία ζώνη στις 2686bp αντιστοιχεί στο μέγεθος του πλασμιδίου pUC19 ενώ η άλλη ζώνη στις 1600περίπου βάσεις αντιστοιχεί στο μέγεθος της ένθεσης.



Εικ. 25: Ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUC19 με την ένθεση 1300bp μετά από την πέψη με τις ενδονουκλεάσες EcoRI και Hind III. Επιλέχθηκαν τα δείγματα που έχουν επισημανθεί με κίτρινο χρώμα και στα οποία παρουσιάζονται δύο ζώνες. Η μια στις 2686bp (πλασμίδιο) και η άλλη στις 1600περίπου βάσεις (ένθεση).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν πως τα δύο δείγματα *1600-a* και *1600-b* (προέκυψαν από το ζεύγος εκκινητών *5FK1-dT17XhoI* και αντιστοιχούσαν σε ζώνη περίπου 1600βάσεων,εικ.24) παρουσίασαν υψηλό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους, και συγκεκριμένα το *1600-b* φέρει 100% ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο με το 5' άκρο του γονιδίου που έχει ήδη απομονωθεί, ενώ τα πέντε δείγματα που αντιστοιχούσαν στην ένθεση των 1300βάσεων (εικ.25) δεν παρουσίασαν ομολογία ούτε μεταξύ τους αλλά ούτε με το τμήμα του γονιδίου που είχε ήδη απομονωθεί. Στη συνέχεια χρειάστηκε να επιβεβαιωθεί αν τα δύο αυτά γονίδια (*1600-a* και *1600-b*) είναι διαφορετικά ή πρόκειται για αλληλόμορφα. Για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές από τις 5' και 3'

αμετάφραστες περιοχές (πρόκειται για περιοχές που δεν είναι συντηρημένες μεταξύ των μελών μιας οικογένειας γονιδίων). Επιπλέον ο σχεδιασμός εκκινητών από τις περιοχές αυτές βοήθησε στο να καταλήξουμε στο πλήρες και ενιαίο cDNA του γονιδίου.

```

1600b : TTCATCGTTTTTCCTCTTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCCGAAAAGATTGCCACCATCTCCACCAA : 76
1600a : TTCATCGTTTTTCCTCTTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCCGAAAAGATTGCCACCATCTCCACCAA : 76
          TTCATCGTTTTTCCTCTTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCCGAAAAGATTGCCACCATCTCCACCAA

1600b : AGCTTCCCATAAATGGAAATCTTCACCAACTCGGCCAACTCCCCATCGCTCACTGCAAGCCTATCCAAAAGCTA : 152
1600a : AGCTTCCCATAAATGGAAATCTTCACCAACTCGGCCAACTCCCCATCGCTCACTGCAAGCCTATCCAAAAGCTA : 152
          AGCTTCCCATAAATGGAAATCTTCACCAACTCGGCCAACTCCCCATCGCTCACTGCAAGCCTATCCAAAAGCTA

1600b : GGGTCCCTCATGTGTGCTCATTTGGGAGATTGCCAGTACTTGTGTCTCCTCTGTGATGCTGCTCAGAAATC : 228
1600a : TGGTCCCTCATGTGTGCTCATTTGGGAGATTGCCAGTACTTGTGTCTCCTCTGTGATGCTGCTCAGAAATC : 228
          GGTCCCTCATGTGTGCTCATTTGGGAGATTGCCAGTACTTGTGTCTCCTCTGTGATGCTGCTCAGAAATC

1600b : ATGAAAAATCAGGACGTGCTTTTCTCAAACAGGCCGAAATGAGAGTTATCGACAAAATTATATATGGCTCTAAGG : 304
1600a : ATGAAAAATCAGGACGTGCTTTTCTCAAACAGGCCGAAATGAGAGTTATCGACAAAATTATATATGGCTCTAAGG : 304
          ATGAAAAATCAGGACGTGCTTTTCTCAAACAGGCCGAAATGAGAGTTATCGACAAAATTATATATGGCTCTAAGG

1600b : ACATGCTTTTGCTCCATATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTTCAGCTTTTGAGTAATAA : 380
1600a : ACATGCTTTTGCTCCATATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTTCAGCTTTTGAGTAATAA : 380
          ACATGCTTTTGCTCCATATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTTCAGCTTTTGAGTAATAA

1600b : GAGGGTTCAATCCTTTCGTCTGTAAAGAGAAGAAGAAATGCCCTTATGATGAGAAAATTAGACATCTCTTCTTCA : 456
1600a : GAGGGTTCAATCCTTTCGTCTGTAAAGAGAAGAAGAAATGCCCTTATGATGAGAAAATTAGACATCTCTTCTTCA : 456
          GAGGGTTCAATCCTTTCGTCTGTAAAGAGAAGAAGAAATGCCCTTATGATGAGAAAATTAGACATCTCTTCTTCA

1600b : TCTTCAATAAACTTGAGCAATATATTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAAT : 532
1600a : TCTTCAATAAACTTGAGCAATATATTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAAT : 532
          TCTTCAATAAACTTGAGCAATATATTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAAT

1600b : ATATTGATGCACAAGAAAGCAGCAAAAATTTGTGTCGAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCAGCTTTTAAATC : 607
1600a : ATATTGATGCACAAGAAAGCAGCAAAAATTTGTGTCGAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCAGCTTTTAAATC : 607
          ATATTGATGCACAAGAAAGCAGCAAAAATTTGTGTCGAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCAGCTTTTAAATC

1600b : CAGGGGATTACATCCATGGCTTGACTGGATTAAACGCGTAAATGATTTCAATGCAAATGTTGAGAAAATGGCTAG : 683
1600a : CAGGGGATTACATCCATGGCTTGACTGGATTAAACGCGTAAATGATTTCAATGCAAATGTTGAGAAAATGGCTAG : 683
          CAGGGGATTACATCCATGGCTTGACTGGATTAAACGCGTAAATGATTTCAATGCAAATGTTGAGAAAATGGCTAG

1600b : ATGGTTTGATGATTTTTTTCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAAATCGAAAATAAGAGAGACAAAACCTGAAAGAC : 759
1600a : ATGGTTTGATGATTTTTTTCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAAATCGAAAATAAGAGAGACAAAACCTGAAAGAC : 760
          ATGGTTTGATGATTTTTTTCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAAATCGAAAATAAGAGAGACAAAACCTGAAAGAC

1600b : AGCAGCAATGAAGAGATCTTGTGGACATATTGATCGAAATTCAGAGAGAAAAATGCGCTGGTTCCCCCTATAGAAA : 835
1600a : AGCAGCAATGAAGAGATCTTGTGGACATATTGATCGAAATTCAGAGAGAAAAATGCGCTGGTTCCCCCTATAGAAA : 836
          AGCAGCAATGAAGAGATCTTGTGGACATATTGATCGAAATTCAGAGAGAAAAATGCGCTGGTTCCCCCTATAGAAA

1600b : ATGATACAATCAAAGCTGTGCATTTTGATATTTTGTGGCTGGGACAGATACATCATCTCTGCTTTGGTGTGGAT : 911
1600a : ATGATACAATCAAAGCTGTGCATTTTGATATTTTGTGGCTGGGACAGATACATCATCTCTGCTTTGGTGTGGAT : 912
          ATGATACAATCAAAGCTGTGCATTTTGATATTTTGTGGCTGGGACAGATACATCATCTCTGCTTTGGTGTGGAT

```

```

          920          *          940          *          960          *          980
1600b : AATGGCAGAGCTATTAAAGCACCCAAAATCCATGGAGAAATTCAGAACGAGGCGAGACAAGTAGCCGGAAGTAAA : 987
1600a : AATGGCAGAGCTATTAAAGCACCCAAAATCCATGGAGAAATTCAGAACGAGGCGAGACAAGTAGCCGGAAGTAAA : 988
        AATGGCAGAGCTATT AAGCACCCAAAATCCATGGAGAAATTCAGAACGAGG GAGACAAGTAGC GGAAGTAAA

          *          1000          *          1020          *          1040          *          1060
1600b : TTAGATCTAACAGAGGATGATTTAGATAAAAATGCTCTATTAAAGGCCGTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATC : 1063
1600a : TTAGATCTAACAGAGGATGATTTAGATAAAAATGCTCTATTAAAGGCCGTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATC : 1064
        TTAGAT TAACAGA GATGATTTAGATAAAAATGCTCTATTAAAGGC GTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATC

          *          1080          *          1100          *          1120          *          1140
1600b : CCCCACTTCCATTCTACTCCCTCGAGAATCTACACAAGATACAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTTAA AAC : 1139
1600a : CTC CAGCTCCATTCTACTCCCTCGAGAATCTACACAAGATACAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTTGG AAC : 1140
        C CCA TCCATT CTACTCCCTCGAGAATCTACACAAGATA CAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTT AAC

          *          1160          *          1180          *          1200          *
1600b : CCGAGTGATAATCAATTCATGGGCAATGCAAGAGACCCCTTCTTATGGGAAAATCCGAAGATTTTTCAGAGAA : 1215
1600a : CCGAGTGATAATCAATTCATGGGCAATGCAAGAGACCCATTTCTGGGAAAATCCGAAGATTTTTCAGAGAA : 1216
        CCGAGTGATAATCAATTC TGGGCAAT GCAAGAGACCC TT T TGGGAAAATCC GAAGATTTTTCAGAGAA

          1220          *          1240          *          1260          *          1280          *
1600b : AGATTTTTAGACACGGGAATGGACTTTAGAGGGCTTAATTTTGAGTACATTCCATTTGGTGC CGGTCCAGAGGGCT : 1291
1600a : AGATTTTTAGACACGGGAATGGACTTTAGAGGGCTTAATTTTGAGTACATTCCATTTGGTGC CGGTCCAGAGGGCT : 1292
        AGATTTTTAGACACGGGAATGGACT TTAGAGGGCTTAATTTTGAGTACATTCCATTTGGTG CGGTCCAGAGGGCT

          1300          *          1320          *          1340          *          1360
1600b : GTCCTGGAATTACATTTGCTATTTGCTGCTGAGCTTGCATTAGCAAAATTCATGCTTAATTTAACTTTGCTT : 1367
1600a : GTCCTGGAATTACATTTGCTATTTGCTGCTGAGCTTGCATTAGCAAAATTCATGCTTAATTTAACTTTGCTT : 1368
        GTCCTGGAATTACATTTGC AT C GTCG TGAGCTTGCATTAGCAAAATTC TGCTTAATTTAACTTTG CTT

          *          1380          *          1400          *          1420          *          1440
1600b : GCCCATGGGAGAAACGGAAAAGATTTGGACATGACTGAATCCCTGGGAGACACTGTCTCTAAAAAATTCCTCTA : 1443
1600a : GCCCATGGGAGAAAGTAGAAAAGATTTGGACATGACTGAATCCCTGGGAGACACTGTCTCTAAAAAATTCCTCTA : 1444
        GCC CATGGGAG A GAAAAGATTTGGACATGACT GAATC CCTGGGAGA ACTGTCT TAAAAA ATTCCTCTA

          *          1460          *          1480          *          1500          *          1520
1600b : CTTGTGACCGTTAGAGAGAAATAAATACTAAGATAA-TATTAAATAATAATTTATCTTTCTCTCTATCC : 1518
1600a : CTTGTGACCGTTAGAGAGAAAGACAAATATTAGCTAAGATAA-TATTAAATAATAATTTATCTTTAT----ATCC : 1516
        CTTGTGAC GTTA AGAGAA A AAATA TA CTAAGATAA TATT AATAA TAATTTATCTTT T ATCC

          *          1540          *          1560          *          1580          *
1600b : ATAATTATCTTTACCGGTATTTTCACTCTATAAAACCTCCGTGAATTTCTATAATATCATGTACCAAATAAATAGA : 1594
1600a : ATAATTATCTTTCTGTGTACTAGTAAATAGCCAAAT-----TATA-CTTACCTATCAATAAATAG- : 1578
        ATAATTATCTTT GTA T A T AA A TATA T A TA CAA A AA TAG

          1600          *          1620          *          1640
1600b : AAGTGTCTTTTATTTCCTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA : 1645
1600a : --TTGTCTCTTACCGTATTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA : 1625
        TGT T TTA T T AAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

```

Εικ.26: Σύγκριση νουκλεοτιδικών ακολουθιών μεταξύ των δύο γονιδίων 1600a και 1600b μετά από την πρώτη αλληλούχιση.

2.2 Σχεδιασμός εκκινητών από τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές

Πριν από την ακολουθία του 5FK1 εκκινητή (εικ.18) που σχεδιάστηκε στο 5' άκρο του γονιδίου και πριν από το κωδικόνιο έναρξης του αναγνωστικού πλαισίου είχε απομονωθεί και μια περιοχή 64 νουκλεοτιδίων, η οποία αντιστοιχεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR). Από την περιοχή αυτή σχεδιάστηκε ένας ορθός εκκινητής, κοινός και για τα δύο γονίδια. Από την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) σχεδιάστηκαν δύο διαφορετικοί ανάστροφοι εκκινητές, όπου ο κάθε ένας από αυτούς σχεδιάστηκε σε μη- συντηρημένες περιοχές μεταξύ των δύο νουκλεοτιδικών ακολουθιών των γονιδίων.

Τα ονόματα, οι ακολουθίες και τα T_m των εκκινητών δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

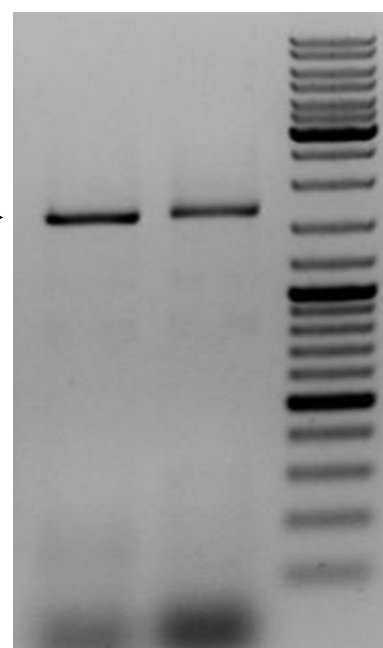
Εκκινητής	Αλληλουχία	T_m
5UTR-F	5' GTC TGC CTA ATT AAA TAG TAG AGC 3'	58 °C
3UTR-RA	5' GGC TAA TTA CTA GTA CAC AGA AAG 3'	58 °C
3UTR-RB	5' GGT ACA TGA TAT ATA GAA ATT ACA GGAG 3'	59.6 °C

Ακολούθησαν αντιδράσεις PCR με τα ζεύγη των εκκινητών 5UTR-F / 3UTR-RA και 5UTR-F / 3UTR-RB, με μήτρα 2μl cDNA από την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής και χρήση της DNA πολυμεράσης *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes*.

Το αναμενόμενο μέγεθος των ζωνών και για τα δύο ζεύγη εκκινητών κυμαίνεται περίπου στις 1650bp. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

Το πρόγραμμα PCR που πραγματοποιήθηκε με εκκινητές: 5UTR-F / 3UTR-RA και 5UTR-F / 3UTR-RB.	
1).	94 °C for 2:00
2).	94 °C for 0:30
3).	62 °C for 0:30
4).	72 °C for 1:00
5).	Go to step 2, 27 times
6).	72 °C for 10:00
7).	12°C hold

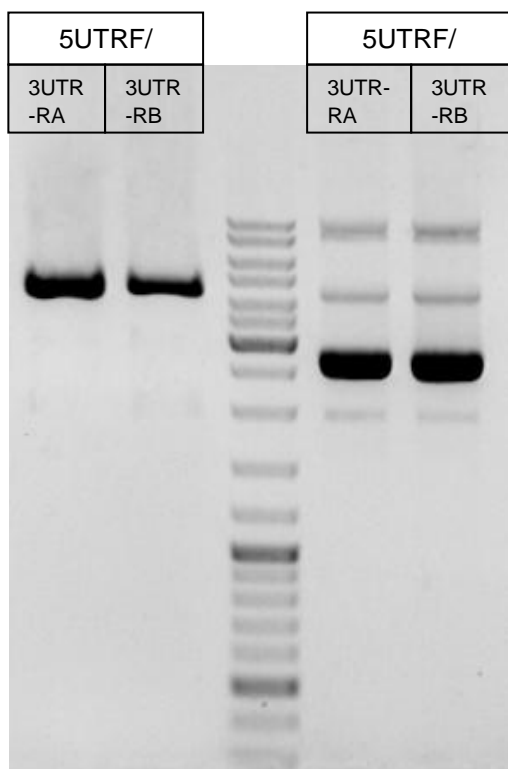
1650 bp ≈ →



Εικ.27: Στη πρώτη στήλη το προϊόν της αντίδρασης με εκκινητές 5UTR-F/ 3UTR-RA, στη δεύτερη στήλη το προϊόν της αντίδρασης με εκκινητές 5UTR-F/ 3UTR-RB και στη τρίτη στήλη ο δείκτης μοριακών βαρών Gene Ruler DNA Ladder Mix.

Στη συνέχεια ακολούθησε:

- Οι ζώνες των δειγμάτων στην εικόνα 27 απομονώθηκαν από την πηκτή αγαρόζης και ακολούθησε καθαρισμός της κάθε μάντας με την χρήση του Nucleospin Gel and PCR Clean-up, Macherey nagel
- Ενσωμάτωση σε πλασμιδιακό φορέα (pUC 19) στη θέση περιορισμού SmaI με την χρήση του ενζύμου T4 DNA ligase, 5U/μl
- Μετασχηματισμός και κλωνοποίηση δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a, *E. coli*
- Απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από τα μετασχηματισμένα κύτταρα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης
- Διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και Hind III. Στα δείγματα που επιλέχθηκαν μετά από τις διαγνωστικές πέψεις, έγινε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI για να ελεγχθεί αν όντως η ένθεση έχει εισέλθει μία φορά στο πλασμίδιο.
- Απομόνωση πλασμιδίου χρησιμοποιώντας Nucleospin Plasmid / Plasmid (No Lid), Macherey nagel.
- Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών.



Εικ. 28: Στις δύο πρώτες στήλες, ηλεκτροφόρηση 20μl από τα δείγματα (που απομονώθηκαν με εκκινητές 5UTR-F / 3UTR-RA και 5UTR-F / 3UTR-RB) μετά από πέψη με Bam HI. Στις δύο τελευταίες στήλες, 3μl από τα ίδια δείγματα μετά από την απομόνωση πλασμιδίου με Nucleospin Plasmid / Plasmid (No Lid), πριν σταθούν για νουκλεοτιδική αλληλούχιση.

```

*      20      *      40      *      60      *      80
A : GTCTGCCTAATTAAGTAGAGCATCCTATGAATTCTGTGTTTAAAAGAAAATGATTTCTTTTTACATCTGATAGTTC : 80
B : GTCTGCCTAATTAAGTAGAGCATCCTATGAATTCTGTGTTTAAAAGAAAATGATTTCTTTTTACATCTGATAGTTC : 80
   GTCTGCCTAATTAAGTAGAGCATCCTATGAATTCTGTGTTTAAAAGAAAATGATTTCTTTTTACATCTGATAGTTC

*      100     *      120     *      140     *      160
A : CTCTTGTTTCCTTAATTTGTTTACCAGTTTCTCTTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCGGAAAAGATTG : 160
B : CTCTTGTTTCCTTAATTTGTTTACCAGTTTCTCTTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCGGAAAAGATTG : 160
   CTCTTGTTTCCTTAATTTGTTTACCAGTTTCTCTTCAAATGGTATGGAAATCCTTCTTCAACAGCCCGGAAAAGATTG

*      180     *      200     *      220     *      240
A : CCACCATCTCCACCAAGCTTCCCGTAATTGGAAATCTTACCCTACTCAGCCTATTGCCCATCGCTCACTGCAAGCGCT : 240
B : CCACCATCTCCACCAAGCTTCCCGTAATTGGAAATCTTACCCTACTCAGCCTATTGCCCATCGCTCACTGCAAGCGCT : 240
   CCACCATCTCCACCAAGCTTCCCGTAATTGGAAATCTTACCCTACTCAGCCTATTGCCCATCGCTCACTGCAAGCGCT

*      260     *      280     *      300     *      320
A : ATCCAAAAGCTATGGTCCACTCATGTTGGTCCATCTGGGAAGAATGCCAGTACTAATCGTCTCCTCTGCTGATGCAGCTC : 320
B : ATCCAAAAGCTATGGTCCACTCATGTTGGTCCATCTGGGAAGAATGCCAGTACTAATCGTCTCCTCTGCTGATGCAGCTC : 320
   ATCCAAAAGCTATGGTCCACTCATGTTGGTCCATCTGGGAAGAATGCCAGTACTAATCGTCTCCTCTGCTGATGCAGCTC

*      340     *      360     *      380     *      400
A : GCGAGATCATGAAAAGCCAGGACGTGATTTTCTCAAACAGGCCGAAATGAGAGTTATCGACAAAATATTTTATGGCTCT : 400
B : GCGAGATCATGAAAAGCCAGGACGTGATTTTCTCAAACAGGCCGAAATGAGAGTTATCGACAAAATATTTTATGGCTCT : 400
   GCGAGATCATGAAAAGCCAGGACGTGATTTTCTCAAACAGGCCGAAATGAGAGTTATCGACAAAATATTTTATGGCTCT

*      420     *      440     *      460     *      480
A : AAGGACATAGCTTTTGTCTCTTATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTACAGCTTTTGTAGTAATAA : 480
B : AAGGACATAGCTTTTGTCTCTTATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTACAGCTTTTGTAGTAATAA : 480
   AAGGACATAGCTTTTGTCTCTTATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTACAGCTTTTGTAGTAATAA

*      500     *      520     *      540     *      560
A : GAGGGTTCAATCCTTTTCGTCTGTAAAGAGAAGAAGAAATGTCCCTTATGATCGAGAAAATTAATGTTCTTCTTCATCAT : 560
B : GAGGGTTCAATCCTTTTCGTCTGTAAAGAGAAGAAGAAATGTCCCTTATGATCGAGAAAATTAATGTTCTTCTTCATCAT : 560
   GAGGGTTCAATCCTTTTCGTCTGTAAAGAGAAGAAGAAATGTCCCTTATGATCGAGAAAATTAATGTTCTTCTTCATCAT

*      580     *      600     *      620     *      640
A : CAATAAACTTGAGCAATATATTTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAACATATTGAT : 640
B : CAATAAACTTGAGCAATATATTTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAACATATTGAT : 640
   CAATAAACTTGAGCAATATATTTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTCGAGTGGCCCTGGGGAGGAAACATATTGAT

*      660     *      680     *      700     *      720
A : GCACAAGAAAGCACAAAAATTTGTGTCAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCAGGCTTTTTTAATCTAGGGGATTACAT : 720
B : GCACAAGAAAGCACAAAAATTTGTGTCAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCAGGCTTTTTTAATCTAGGGGATTACAT : 720
   GCACAAGAAAGCACAAAAATTTGTGTCAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCAGGCTTTTTTAATCTAGGGGATTACAT

*      740     *      760     *      780     *      800
A : TCCATGGCTTGACTGGATTAACCGCGTTAATGGTTTCGATGCAAATGTAGAGAAATGGCTAGATGGTTTGATGATTTTT : 800
B : TCCATGGCTTGACTGGATTAACCGCGTTAATGGTTTCGATGCAAATGTAGAGAAATGGCTAGATGGTTTGATGATTTTT : 800
   TCCATGGCTTGACTGGATTAACCGCGTTAATGGTTTCGATGCAAATGTAGAGAAATGGCTAGATGGTTTGATGATTTTT

*      820     *      840     *      860     *      880
A : TCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAGATCGGAAGAAAGGAGAGACAAATGTGATAGACAGCAGCAATGAAGTAGATCTT : 880
B : TCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAGATCGGAAGAAAGGAGAGACAAATGTGATAGACAGCAGCAATGAAGTAGATCTT : 880
   TCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAGATCGGAAGAAAGGAGAGACAAATGTGATAGACAGCAGCAATGAAGTAGATCTT

*      900     *      920     *      940     *      960
A : GTGGACATATTGCTCGAAAATTCAGAGAGAAAATGTGGCTGGTTCOCCTATAGAAAATGATACAATCAAAGCTGTCATCTT : 960
B : GTGGACATATTGCTCGAAAATTCAGAGAGAAAATGTGGCTGGTTCOCCTATAGAAAATGATACAATCAAAGCTGTCATCTT : 960
   GTGGACATATTGCTCGAAAATTCAGAGAGAAAATGTGGCTGGTTCOCCTATAGAAAATGATACAATCAAAGCTGTCATCTT

```

```

*           980           *           1000           *           1020           *           1040
A : TGATATGTTTGTGGCTGGGACAGATACATCATCTTCTGCTTTGGTGTGGACAATGGCAGAGCTATTGAAGCACCCAAAAAT : 1040
B : TGATATGTTTGTGGCTGGGACAGATACATCATCTTCTGCTTTGGTGTGGACAATGGCAGAGCTATTGAAGCACCCAAAAAT : 1040
   TGATATGTTTGTGGCTGGGACAGATACATCATCTTCTGCTTTGGTGTGGACAATGGCAGAGCTATTGAAGCACCCAAAAAT

*           1060           *           1080           *           1100           *           1120
A : CCATGGAGAAATGCAGAACGAGGCGAGACAAGTAGCTGGAAGTAAATTAGATATAACAGAGGATGATTTAGATAAAAATG : 1120
B : CCATGGAGAAATGCAGAACGAGGCGAGACAAGTAGCTGGAAGTAAATTAGATATAACAGAGGATGATTTAGATAAAAATG : 1120
   CCATGGAGAAATGCAGAACGAGGCGAGACAAGTAGCTGGAAGTAAATTAGATATAACAGAGGATGATTTAGATAAAAATG

*           1140           *           1160           *           1180           *           1200
A : CTCTATTTAAAGGCAGTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATCCTCCAGCTCCATTGCTACTCCCTCGAGAATCTACACA : 1200
B : CTCTATTTAAAGGCAGTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATCCTCCAGCTCCATTGCTACTCCCTCGAGAATCTACACA : 1200
   CTCTATTTAAAGGCAGTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATCCTCCAGCTCCATTGCTACTCCCTCGAGAATCTACACA

*           1220           *           1240           *           1260           *           1280
A : AGATAGCAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTTGGAACCCGAGTGATAATCAATTCTGGGCAATCGCAAGAGACCCAT : 1280
B : AGATAGCAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTTGGAACCCGAGTGATAATCAATTCTGGGCAATCGCAAGAGACCCAT : 1280
   AGATAGCAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTTGGAACCCGAGTGATAATCAATTCTGGGCAATCGCAAGAGACCCAT

*           1300           *           1320           *           1340           *           1360
A : TTTCGTGGGAAAATCCGGAAGATTTTGTCCAGAAAAGATTTTAGACACGGGAATGGACTATAGAGGGCTTAATTTTGAG : 1360
B : TTTCGTGGGAAAATCCGGAAGATTTTGTCCAGAAAAGATTTTAGACACGGGAATGGACTATAGAGGGCTTAATTTTGAG : 1360
   TTTCGTGGGAAAATCCGGAAGATTTTGTCCAGAAAAGATTTTAGACACGGGAATGGACTATAGAGGGCTTAATTTTGAG

*           1380           *           1400           *           1420           *           1440
A : TACATTCCATTTGGTGCCGGTTCGGAGAGGCTGTCTGGAATTACATTTGCCATGACCGTCGATGAGCTTGCATTAGCAAA : 1440
B : TACATTCCATTTGGTGCCGGTTCGGAGAGGCTGTCTGGAATTACATTTGCCATGACCGTCGATGAGCTTGCATTAGCAAA : 1440
   TACATTCCATTTGGTGCCGGTTCGGAGAGGCTGTCTGGAATTACATTTGCCATGACCGTCGATGAGCTTGCATTAGCAAA

*           1460           *           1480           *           1500           *           1520
A : ATTGGTGCTTAATTTTAACTTTGCCTTGCCGCATGGAGAAGTAGAAAAAGATTTGGACATGACAGAATCCCCTGGAGAGA : 1520
B : ATTGGTGCTTAATTTTAACTTTGCCTTGCCGCATGGAGAAGTAGAAAAAGATTTGGACATGACAGAATCCCCTGGAGAGA : 1520
   ATTGGTGCTTAATTTTAACTTTGCCTTGCCGCATGGAGAAGTAGAAAAAGATTTGGACATGACAGAATCCCCTGGAGAGA

*           1540           *           1560           *           1580           *           1600
A : CTGTCTGTAAAAAGATTCCCTCTACTTGTGACTGTTAAAGAGAACGACAAAATATTAGCTAAGATAAAATATTGAATAAATAA : 1600
B : CTGTCTGTAAAAAGATTCCCTCTACTTGTGACTGTTAAAGAGAACGACAAAATATTAGCTAAGATAAAATATTGAATAAATAA : 1600
   CTGTCTGTAAAAAGATTCCCTCTACTTGTGACTGTTAAAGAGAACGACAAAATATTAGCTAAGATAAAATATTGAATAAATAA

*           1620           *           1640
A : TTTATCTTTATATCCAATAATTAATCTTTCTGTGTAAGTAAATTAGCC : 1647
B : TTTATCTTTATATCCA-AAAAA-AAAAAAAAAAAAAACTCGAGGTCGAC- : 1645
   TTTATCTTTATATCCA AA A ACT G T C

```

Εικ.29: Σύγκριση νουκλεοτιδικών ακολουθιών μεταξύ των γονιδίων A και B μετά από την δεύτερη αλληλούχιση.

Συγκρίνοντας λοιπόν τις ακολουθίες των δύο γονιδίων A και B (εκκινητές 5UTR-F / 3UTR-RA και 5UTR-F / 3UTR-RB αντίστοιχα) παρατηρείται ότι σε νουκλεοτιδικό επίπεδο υπάρχουν 24 διαφορές, 22 εκ των οποίων βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή, αναμενόμενο δεδομένου ότι στην περιοχή αυτή οι αλληλουχίες των γονιδίων της ίδιας οικογένειας είναι συνήθως μη- συντηρημένες, ενώ σε αμινοξικό επίπεδο σημειώνονται μόνο δύο διαφορές.

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
A : MISFSLIVPLVSLILFTVFLFKWYGNPSSSTARKRLPPSPKLPVIGNLHQLSLLPHRSLQALSKSYGPLMLVHLGRMPVL : 81
B : MISFSLIVPLVSLILFTVFLFKWYGNPSSSTARKRLPPSPKLPVIGNLHQLSLLPHRSLQALSKSYGPLMLVHLGRMPVL : 81
MISFSLIVPLVSLILFTVFLFKWYGNPSSSTARKRLPPSPKLPVIGNLHQLSLLPHRSLQALSKSYGPLMLVHLGRMPVL

      *           100          *           120          *           140          *           160
A : IVSSADAAREIMKSQDVI FSNRPKLRVIDKI IYGSKDIAFAPYGEYWRQVRSICVLQLLSNKRVQSFRRVREEEEMSLMIEK : 162
B : IVSSADAAREIMKSQDVI FSNRPKLRVIDKI IYGSKDIAFAPYGEYWRQVRSICVLQLLSNKRVQSFRRVREEEEMSLMIEK : 162
IVSSADAAREIMKSQDVI FSNRPKLRVIDKI IYGSKDIAFAPYGEYWRQVRSICVLQLLSNKRVQSFRRVREEEEMSLMIEK

      *           180          *           200          *           220          *           240
A : IKCSSSSSINLSNIFVSLTNDIICRVALGRKHI DAQESTKIVSKLKEFQELAGFFNLGDYIPWLDWINRVNGFDANVEKLA : 243
B : IKCSSSSSINLSNIFVSLTNDIICRVALGRKHI DAQESTKIVSKLKEFQELAGFFNLGDYIPWLDWINRVNGFDANVEKLA : 243
IKCSSSSSINLSNIFVSLTNDIICRVALGRKHI DAQESTKIVSKLKEFQELAGFFNLGDYIPWLDWINRVNGFDANVEKLA

      *           260          *           280          *           300          *           320
A : RWDDDFEFGVIEEHRDRKKGGETNVIDSSNEVDLVDILLEIQRENVAGSPIENDTIKAVIFDMFVAGTDTSSSALVWTMAEL : 324
B : RWDDDFEFGVIEEHRDRKKGGETNVIDSSNEVDLVDILLEIQRENVAGSPIENDTIKAVIFDMFVAGTDTSSSALVWTMAEL : 324
RWDDDFEFGVIEEHRDRKKGGETNVIDSSNEVDLVDILLEIQRENVAGSPIENDTIKAVIFDMFVAGTDTSSSALVWTMAEL

      *           340          *           360          *           380          *           400
A : LKHPKSMEKLQNEARQVAGSKLDITEDDLKMLYLKAVMKESLRLHPPAPLLLPRESTQDSKILGYDIAVGTRVINSWAI : 405
B : LKHPKSMEKLQNEARQVAGSKLDITEDDLKMLYLKAVMKESLRLHPPAPLLLPRESTQDSKILGYDIAVGTRVINSWAI : 405
LKHPKSMEKLQNEARQVAGSKLDITEDDLKMLYLKAVMKESLRLHPPAPLLLPRESTQDSKILGYDIAVGTRVINSWAI

      *           420          *           440          *           460          *           480
A : ARDPFSWENPEDFCPEFLDTGMDYRGLNFEYIPFGAGRRCGPGITFAMTVDELALAKLVNFNFALPHGEVEKDLDMTES : 486
B : ARDPFSWENPEDFCPEFLDTGMDYRGLNFEYIPFGAGRRCGPGITFAMTVDELALAKLVNFNFALPHGEVEKDLDMTES : 486
ARDPFSWENPEDFCPEFLDTGMDYRGLNFEYIPFGAGRRCGPGITFAMTVDELALAKLVNFNFALPHGEVEKDLDMTES

      *           500
A : PGETVCKKIPLLVTVKENDKY : 507
B : PGETVCKKIPLLVTVKENDKY : 507
PGETVCKKIPLLVTVKENDKY

```

Εικ.30: Σύγκριση αμινοξικών ακολουθιών των γονιδίων A και B μετά από την δεύτερη αλληλούχιση.

Οι ακολουθίες των δύο γονιδίων φέρουν το ίδιο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που αντιστοιχεί σε 1524βάσεις και 507 αμινοξέα.

Διαπιστώνεται ότι παρά το γεγονός ότι σχεδιάστηκαν δύο διαφορετικοί ανάστροφοι εκκινήτες από την 3'UTR περιοχή, τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση έδειξαν ότι πρόκειται για το ίδιο γονίδιο.

3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση ολόκληρου του γονιδίου *CYP71A*. Το αποτέλεσμα είναι ένα τμήμα 1647 βάσεων που αντιστοιχεί σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 1524 βάσεων ή 507 αμινοξέων. Από την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή έχουν καταγραφεί 52 νουκλεοτίδια πριν την μεθειονίνη, ενώ από την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή η αλληλουχία έφτασε 71 νουκλεοτίδια μετά το πρώτο κωδικόνιο λήξης.

GTCTGCCTAATTAATAGTAGAGCATCCTATGAATTCTGTGTTTAAAAGAAA
ATGATTTCTTTTACATCTGATAGTTCCTCTTGTTTCCTAATTTTGTTCACCGTTTTCTCTTCAAATGGT
ATGGAATCCTTCTTCAACAGCCCGGAAAAGATTGCCACCATCTCCACCAAAGCTTCCCGTAATTGGAAAT
CTTACCAACTCAGCCTATTGCCCATCGCTCACTGCAAGCGCTATCCAAAAGCTATGGTCCACTCATGTT
GGTCCATCTGGGAAGAATGCCAGTACTAATCGTCTCCTCTGCTGATGCAGCTCGCGAGATCATGAAAAGCC
AGGACGTGATTTTCTCAACAGGCCGAAAATTGAGAGTTATCGACAAAATTATTTATGGCTCTAAGGACATA
GCTTTTGCTCCTTATGGTGAGTACTGGAGGCAGGTGAGAAGTATATGTGTGCTACAGCTTTTGAGTAATAA
GAGGGTTCAATCCTTTCGTCGTGTAAGAGAAGAAGAAATGTCCCTTATGATCGAGAAAATTAATGTTCTT
CTTCATCATCAATAAACTTGAGCAATATATTTGTGTCACTTACTAATGATATCATATGTGAGTGGCCCTGGG
GAGGAAACATATTGATGCACAAGAAAGCACAAAAATTGTGTCAAAGCTGAAGGAATTTCAAGAGTTAGCA
GGCTTTTTTAATCTAGGGGATTACATTCCATGGCTTGACTIONAACC GCGTAAATGGTTTCGATGCAAAT
GTAGAGAAATTGGCTAGATGGTTTGATGATTTTTTCGAAGGTGTAATTGAAGAGCACAGAGATCGGAAGAA
AGGAGAGACAAATGTGATAGACAGCAGCAATGAAGTAGATCTTGTGGACATATTGCTCGAAATTCAGAGA
GAAAATGTGGCTGGTCCCCTATAGAAAATGATACAATCAAAGCTGTCATCTTTGATATGTTTGTGGCTGG
GACAGATACATCATCTTCTGCTTTGGTGTGGACAATGGCAGAGCTATTGAAGCACCCAAAATCCATGGAGA
AATTGCAGAACGAGGCGAGACAAGTAGCTGGAAGTAAATTAGATATAACAGAGGATGATTTAGATAAAATG
CTCTATTTAAAGGCAGTGATGAAAGAGAGTCTACGACTACATCCTCCAGCTCCATTGCTACTCCCTCGAGA
ATCTACACAAGATAGCAAAATATTAGGCTATGACATTGCAGTTGGAAACCCGAGTGATAATCAATTCCTGGGG
AATCGCAAGAGACCCATTTTCGTGGGAAAATCCGGAAGATTTTTGTCCAGAAAGATTTTATAGACACGGGAA
TGGACTATAGAGGGCTTAATTTTGAAGTACATTCCATTTGGTGC CGGTCCGAGAGGCTGTCTGGAATTACA
TTTGCCATGACCGTCGATGAGCTTGCATTAGCAAAATTGGTGTCTAATTTTAACTTTGCCTTGCCGCATGGA
GAAGTAGAAAAAGATTTGGACATGACAGAATCCCCTGGAGAGACTGTCTGTAAAAAGATTCCTCTACTTGT
GACTGTAAAGAGAACGACAAATATTAG
CTAAGATAAATATTGAATAAATAATTTATCTTTATATCCATAATTATCTTTCTGTGTACTAGTAATTAGCC

Εικ.31: Νουκλεοτιδική ακολουθία ολόκληρου του γονιδίου *CYP71 A-Olea*. Με έντονη γραμματοσειρά επισημαίνεται το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου που αντιστοιχεί σε 1524 βάσεις.

MISFSLIVPLVSLILFTVFLFKWYGNPSSARKRLPPSPKLPVIGNLHQLSLLPHRSLQALS KSYGPLMLVH
LGRMPVLIVSSADAAREIMKSQDVIFSNRPKLRVIDKIIYGSKDIAFAPYGEYWRQVRSICVLQLLSNKRVS
FRRVREEEMSLMIEKIKCSSSSINLSNIFVSLTNDIICRVALGRKHIDAQESTKIVSKLKEFQELAGFFNLGDY
IPWLDWINRVNGFDANVEKLARWFDDFFEGVIEEHRDRKKGETNVIDSSNEVDLVDILLEIQRENVAGSPIE
NDTIKAVIFDMFVAGTDTSSSALVWTMAELLKHPKSMEKLNQNEARQVAGSKLDITEDDLKMLYLKAVM
KESLRLHPPAPLLLPRESTQDSKILGYDIAVGTRVIINSWAIARDPFSWENPEDFCPERFLDTGMDYRGLNFE
YIPFGAGRRCPGITFAMTVDELALAKLVLNFNALPHGEVEKDLDMTESPGETVCKKIPLLVTVKENDKY

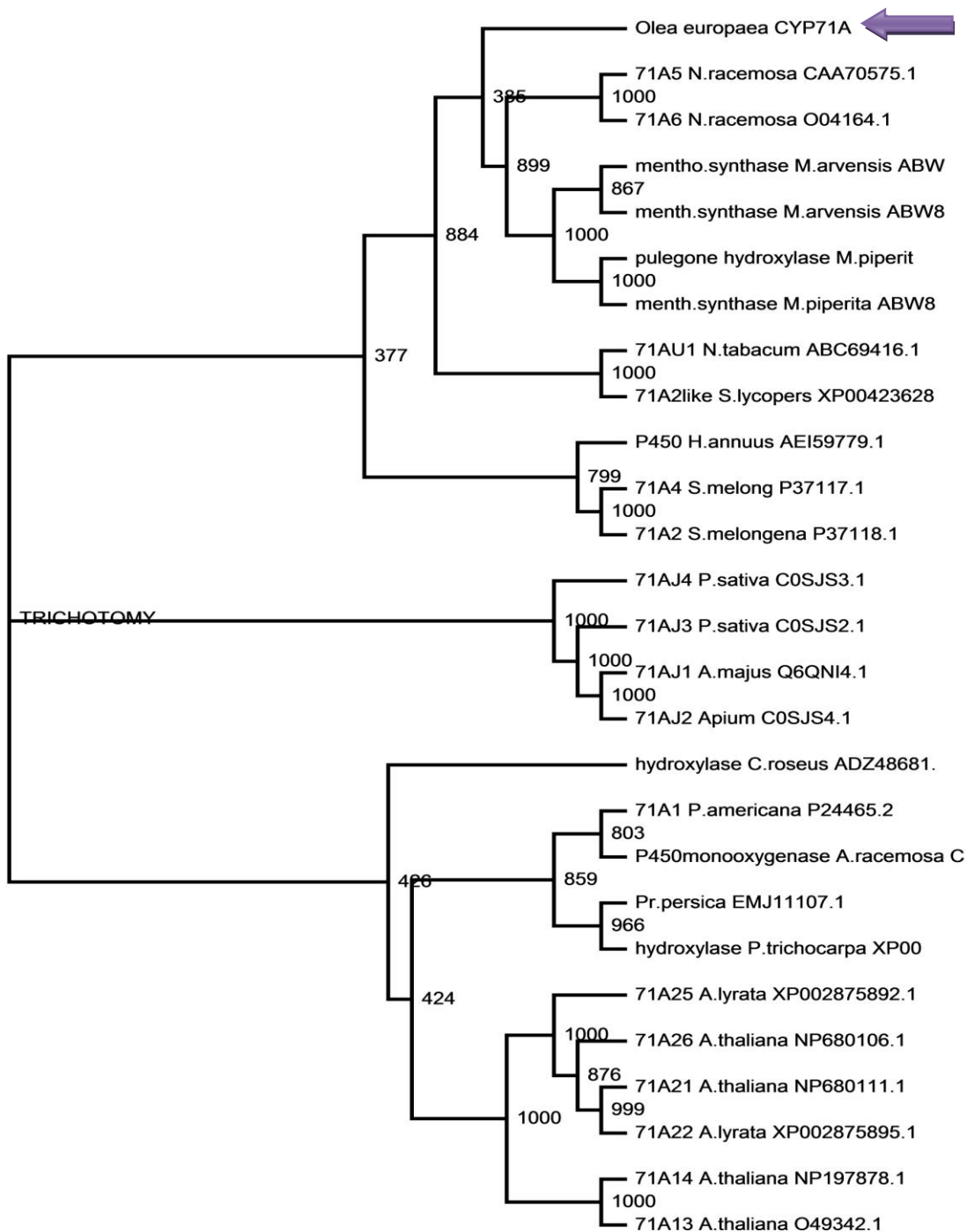
Εικ.32: Η αμινοξική ακολουθία του γονιδίου *CYP71 A-Olea* με ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που αντιστοιχεί σε 507 αμινοξέα.

Η εισαγωγή της ακολουθίας στο πρόγραμμα **blastx** για την μετάφραση νουκλεοτιδικών ακολουθιών και εύρεση των ομολόγων σε πρωτεϊνικό επίπεδο, έδωσε τα αποτελέσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Accession . No	ΕΙΔΟΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ	Identities	Positives
CAA70575.1	Nepeta racemosa	CYP 71A5	293/505(58%)	389/505(77%)
ABC69416.1	Nicotiana tabacum	CYP 71AU1	275/474(58%)	361/474(76%)
O04164.1	Nepeta racemosa	CYP 71A6	288/505(57%)	375/505(74%)
XP_004236283.1	Solanum lycopersicum	CYP 71A2-like	259/457(57%)	344/457(75%)
P37117.1	Solanum melongena	CYP 71A4	252/458(55%)	324/458(70%)
P37118.1	Solanum melongena	CYP 71A2	256/459(56%)	333/459(72%)
XP_002875892.1	Arabidopsis lyrata	CYP 71A25	229/454(50%)	326/454(71%)
Q6QNI4.1	Ammi majus	CYP 71AJ1	249/506(49%)	349/506(68%)
C0SJS4.1	Apium graveolens	CYP 71AJ2	249/483(52%)	340/483(70%)

ADZ48681.1	Catharanthus roseus	CYP 71BJ1	228/455(50%)	313/455(68%)
COSJS2.1	Pastinaca sativa	CYP 71AJ3	246/483(51%)	334/483(69%)
NP_680111.1	Arabidopsis thaliana	CYP 71A21	233/497(47%)	325/497(65%)
NP_680106.1	Arabidopsis thaliana	CYP 71A26	223/454(49%)	317/454(69%)
P24465.2	Persea americana	CYP 71A1	227/463(49%)	314/463(67%)
XP_002875895.1	Arabidopsis lyrata	CYP71A22	224/454(49%)	312/454(68%)
NP_197878.1	Arabidopsis thaliana	CYP 71A14	237/481(49%)	340/481(70%)

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι το γονίδιο της ελιάς συγκαταλέγεται στην οικογένεια 71 και υποοικογένεια A των φυτικών κυτοχρωμάτων P450. Για την σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ των μελών της οικογένειας 71A, δημιουργήθηκε το παρακάτω φυλογενετικό δεντρόγραμμα συγγένειας.



Εικ.33: Φυλογενετικό δεντρόγραμμα συγγένειας μεταξύ του γονιδίου της ελιάς *CYP71A* με άλλα ομόλογα γονίδια της ίδιας οικογένειας.

Παρατηρείται ότι το γονίδιο *CYP71A* της *Olea europaea* αποτελεί την μία κλάση της ομάδας ενώ η άλλη συμπεριλαμβάνει τα γονίδια P450 των φυτικών ειδών *Nepeta racemosa* (*CYP71A5-CYP71A6*), *Mentha arvensis* (menthofuran synthase), *Nicotiana tabacum* (*CYP71AU1*) και *Solanum*

lycopersicum (*CYP71A2-like*). Αυτό συνεπάγεται ότι τα γονίδια της ομάδας αυτής προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο και κατά την πορεία εξελίχθηκαν τα παραπάνω γονίδια.

4.ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ CYP71A ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Με στόχο την παραγωγή και την απομόνωση της πρωτεΐνης CYP71A, για χρήση αυτής σε περαιτέρω πειράματα, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί η υπερέκφραση της σε βακτήρια *Escherichia coli*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ετερόλογης έκφρασης σε βακτήρια, των φορέων έκφρασης pET και pQE. Τα παραπάνω συστήματα έκφρασης, ως επαγωγικό μέσο χρησιμοποιούν το IPTG και παράγουν πρωτεΐνες συντηγμένες με την ουρά των έξι ιστιδινών στο άμινο- ή/ και στο καρβοξύ- άκρο αυτών. Αναλυτικά η λειτουργία τους περιγράφεται στα << Υλικά και μέθοδοι >>.

Απώτερος σκοπός ήταν η υπερπαραγωγή της εν λόγω πρωτεΐνης και έπειτα η απομόνωση της για τη χρησιμοποίηση αυτής σε πειράματα δραστηκότητας και υποστρωματικής διαφοροποίησης. Ως εκ τούτου χρειαζόταν το αναγνωστικό πλαίσιο της πρωτεΐνης ώστε η παραγόμενη CYP71A να είναι ακέραια και λειτουργική. Για την εύκολη απομόνωση αυτής από το σύνολο των βακτηριακών πρωτεϊνών, η ένθεση έπρεπε να τοποθετηθεί έτσι ώστε να υπάρχουν στο άμινο- ή στο καρβοξύ- άκρο οι 6x Ιστιδίνες (6x His).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα SDS- πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε η διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

4.1 Δημιουργία των κατασκευών έκφρασης

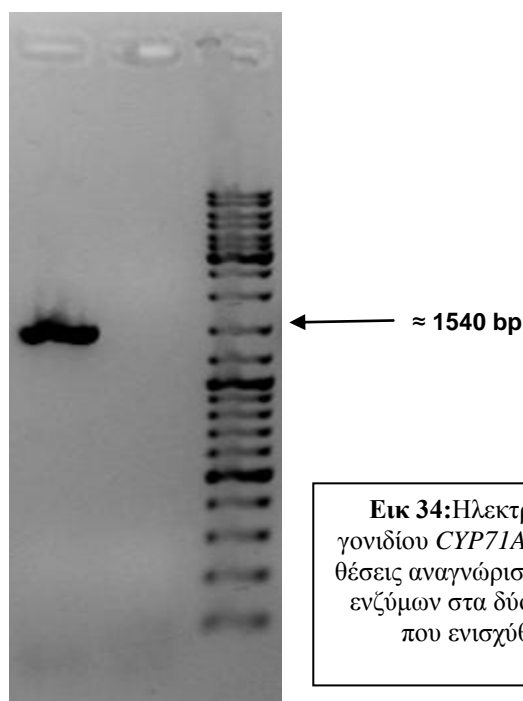
Για την δημιουργία των κατασκευών έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *CYP71A-Olea*, μήκους 1524 bp. Το επιθυμητό τμήμα ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR, με μήτρα το πλασμίδιο που περιείχε το cDNA του εν λόγω γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν και μια τεχνητή θέση ανάγνωσης των περιοριστικών ενζύμων Bam HI (ορθός εκκινητής) και Sac I (ανάστροφος εκκινητής), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Tm
CYP71A Bam HI F	5' CTT GGATCC ATG ATT TCT TTT TCA CATC 3'	61.08°C
CYP71A Sac I R	5' GTT GAGCTC ATA TTT GTC GTT CTC 3'	60.1°C

Σύμφωνα με τον περιοριστικό χάρτη των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης και του cDNA του *CYP71A-Olea*, τα περιοριστικά ένζυμα έχουν μόνο μία θέση αναγνώρισης αυτών σε κάθε φορέα (εντός της περιοχής του πολυσυνδετήρα), ενώ το τμήμα του cDNA *CYP71A* που χρησιμοποιήθηκε δεν διαθέτει περιοχή αναγνώρισης για τα παραπάνω ένζυμα.

Το πρόγραμμα PCR που πραγματοποιήθηκε με εκκινητές: <i>CYP71A Bam HI F / CYP71A Sac I R</i>	
1).	94 °C for 2:00
2).	94 °C for 0:30
3).	60 °C for 0:30
4).	72 °C for 1:00
5).	Go to step 2, 19 times
6).	72 °C for 10:00
7).	12°C hold

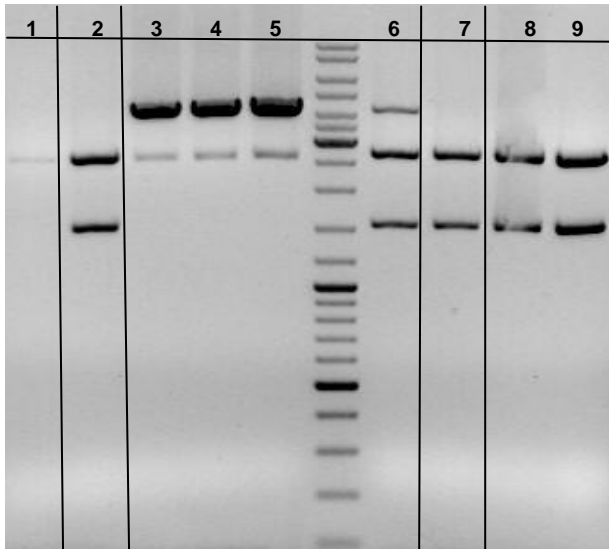
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *CYP71A-Olea* ακολουθώντας το παρακάτω πρόγραμμα της αντίδρασης PCR. Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης, όπως φαίνεται στην εικόνα 34, και το αναμενόμενο μέγεθος της μπάντας είναι 1540 bp.



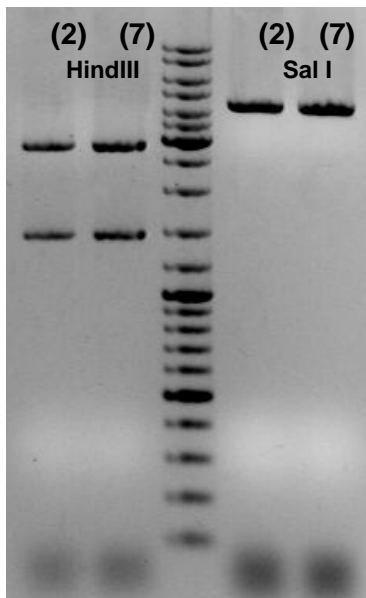
Εικ 34: Ηλεκτροφόρηση 8μl του γονιδίου *CYP71A-Olea* με τις τεχνητές θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων στα δύο άκρα του γονιδίου, που ενισχύθηκε μέσω PCR

Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός της μπάντας από την πηκτή αгарόζης, ενοποίηση του τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα pUC 19, μετασχηματισμός των βακτηριακών δεκτικών κυττάρων DH5a του *E. coli* και απομόνωση του πλασμιδίου μέσω της αλκαλικής λύσης. Στη συνέχεια έγιναν διαγνωστικές πέψεις με το ένζυμο περιορισμού *Bam HI* προκειμένου να επιλεγθούν τα δείγματα στα οποία η θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης *Bam HI* στον φορέα (pUC 19) να βρίσκεται αντιδιαμετρικά ως προς την θέση αναγνώρισης του *Bam HI* στο τμήμα του γονιδίου *CYP71A-Olea*

που απομονώθηκε. Επομένως επιλέχθηκαν τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκαν δύο ζώνες, η μία στις 1550bp και η άλλη στις 2686bp. Όπως φαίνεται στη εικόνα 35 επιλέχθηκαν το δεύτερο και το έβδομο δείγμα για περαιτέρω διαγνωστικές πένψεις με τα ένζυμα περιορισμού Hind III και Sal I. Όπως αναμενόταν μετά από την πέψη με το ένζυμο Hind III προέκυψαν δύο μπάντες, η μία στις 1400bp ενώ η άλλη στις 2700bp, ενώ μετά τη πέψη με το SalI προέκυψε μία ζώνη στις 4000βάσεις περίπου.



Εικ.35 : Ηλεκτροφόρηση 20μl από τα δείγματα (1-5, 6-9) στα οποία πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού Bam HI. Επιλέχθηκαν τα δείγματα 2 και 7 για περαιτέρω πένψεις με τα ένζυμα Hind III και Sal I.

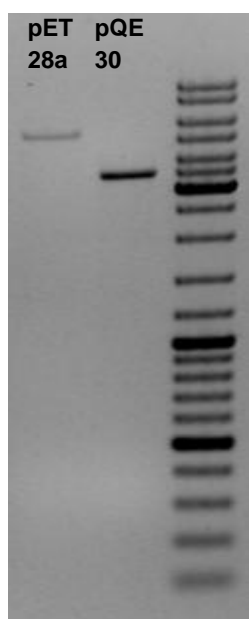


Εικ.36: Στις δύο πρώτες στήλες τα αποτελέσματα από την πέψη των δειγμάτων (2,7) με το ένζυμο HindIII. Στις δύο στήλες δεξιά από τον δείκτη μοριακών βαρών Gene Ruler DNA Ladder Mix, τα δείγματα (2,7) μετά από πέψη με Sal I.

Στη συνέχεια, το γονίδιο *CYP71A-Olea* ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα pUC19, στάλθηκε για αλληλούχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα και η συνέχεια του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του 6xHis- CYP71A. Αφού τα αποτελέσματα από την

αλληλούχιση ήταν τα επιθυμητά, πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα Bam HI και Sac I, έτσι ώστε να απομονωθεί η ένθεση και να γίνει ενοποίηση με τους πλασμιδιακούς φορείς pET28a και pQE30.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης pET 28a και pQE30 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Bam HI και Sac I. Ακολούθησε απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός της μπάντας. Το αναμενόμενο μέγεθος για την ζώνη του pET 28a είναι 5369bp και για την ζώνη του pQE 30 είναι 3461bp.

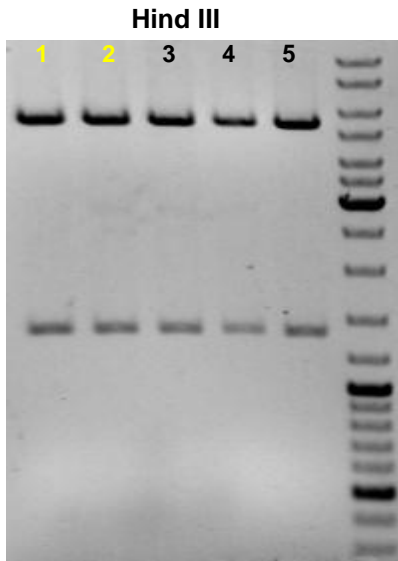


Εικ. 37 : Ηλεκτροφόρηση 2μl από τα δείγματα pET 28a (πρώτη στήλη) και pQE30 (δεύτερη στήλη) μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού Bam HI και Sac I και την απομόνωση των μπαντών από το πήκτωμα αγαρόζης.

Μετά από την λιγοποίηση του γονιδίου στους φορείς pET28a και pQE30, ακολούθησε μετασχηματισμός στα βακτηριακά κύτταρα DH5a και XL1, απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού Hind III, Xho I και Eco RV. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι εικόνες ηλεκτροφόρησης από τις πέψεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων:

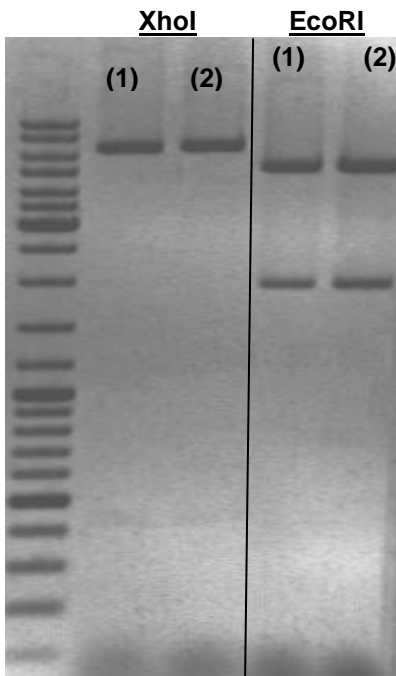
▲ **pET 28a + CYP71A-Olea**

Επιλέχθηκαν πέντε δείγματα από τα οποία έγινε απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και ακολούθησαν πέψεις με το ένζυμο περιορισμού Hind III. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση δύο ζωνών στις 5460bp και στις 1421bp (εικ.38) στο πήκτωμα αγαρόζης, εφόσον θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου υπάρχουν και στο πλασμίδιο αλλά και στην ένθεση.



Εικ.38: *pET 28a /CYP71A-Olea*
 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%,
 20μl από τα δείγματα στα οποία έγινε πέψη
 με το ένζυμο Hind III.

Από τα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν οι δύο πρώτοι κλώνοι για τις ακόλουθες πέψεις επιβεβαίωσης.

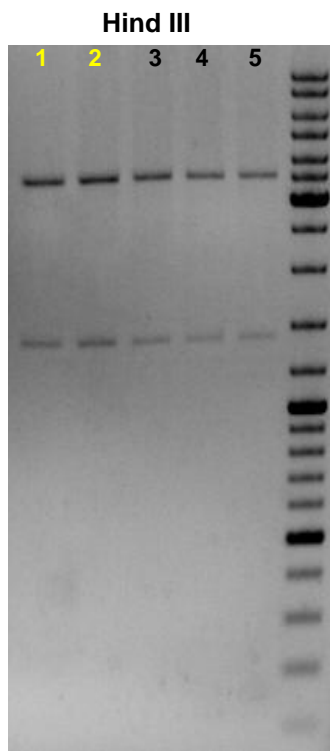


Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν ήταν, όπως φαίνεται και στην εικόνα 39, τα εξής: η πέψη του πλασμιδίου με την ενδονουκλεάση Xho I έδωσε μία ζώνη στις 6470bp και μία στις 430bp, ενώ με το ένζυμο Eco RV έδωσε μία ζώνη στις 4968bp και στις 1925bp.

Εικ.39:*pET 28a /CYP71A-Olea.*
 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%,
 20μl από τα δείγματα στα οποία έγινε
 πέψη με το ένζυμο Xho I και Eco RV.

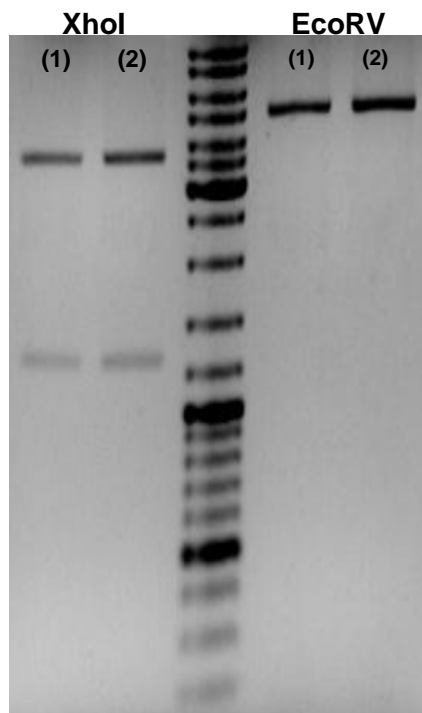
^ **pQE 30 + CYP71A-Olea**

Όπως και στην περίπτωση του pET 28a + CYP71A-Olea, στα πέντε δείγματα που έγινε απομόνωση πλασμιδίου, ακολούθησε αρχικά πέψη με το ένζυμο Hind III. Στο πήκτωμα αγαρόζης παρατηρούνται δύο ζώνες, η μια στις 3555bp και η άλλη στις 1430bp (εικ.40).



Εικ.40: pQE 30 / CYP71A-Olea
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αραρόζης 1%, 20μl από τα δείγματα στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο Hind III.

Τα δύο πρώτα δείγματα επιλέχθηκαν για τις πέψεις με τα ένζυμα Xho I και Eco RV. Τα αποτελέσματα όπως φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα ηλεκτροφόρησης είναι τα εξής: η πέψη με το ένζυμο Xho I έδωσε μία ζώνη στις 3700 bp και άλλη μία στις 1280 bp, ενώ με το Eco RV έδωσε μία μόνο ζώνη στις 4985 bp εφόσον θέση αναγνώρισης του ενζύμου υπάρχει μόνο στο γονίδιο και όχι στον φορέα.



Εικ.41: pQE 30 / CYP71A-Olea
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αραρόζης 1%, 20μl από τα δείγματα στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο Xho I και Eco RV.

Διαπιστώθηκε ότι ο ανασυνδιασμός των πλασμιδίων pET28a και pQE30 με το γονίδιο *CYP71A-Olea* πραγματοποιήθηκε επιτυχώς και αυτό προκύπτει από τα επιθυμητά αποτελέσματα που πάρθηκαν από τις πέψεις που προηγήθηκαν.

Στη συνέχεια ακολούθησε μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα βακτηριακά κύτταρα έκφρασης BL21 για το pET28a και M15-pREP4 για το pQE30, αφού πρώτα δοκιμάστηκε η επαγωγή της έκφρασης στα XL1 BLUE κύτταρα για το pQE30.

4.2 Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης CYP71A-Olea σε βακτηριακά κύτταρα

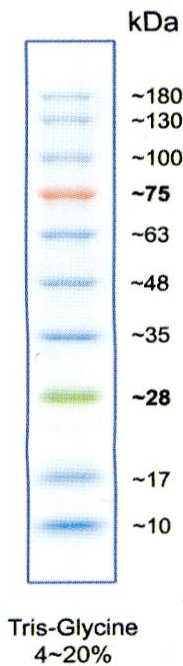
Επόμενο βήμα ήταν η επαγωγή της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης στα βακτηριακά κύτταρα έκφρασης στα οποία έγινε ο μετασχηματισμός. Αρχικά τα κύτταρα αναπτύσσονταν υπό συνθήκες επιλογής σε μικρό όγκο υγρού θρεπτικού υλικού (5ml) ο/ η και στη συνέχεια μικρή ποσότητα αυτών

(50μl) μόλυναν νέα υγρή καλλιέργεια (10ml). Εφόσον αποκτούσαν οι βακτηριακές καλλιέργειες οπτική πυκνότητα O.D.= 0.4-0.5, προστίθετο σε αυτές IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, με σκοπό την επαγωγή του συστήματος έκφρασης. Δείγματα λήφθηκαν πριν την επαγωγή της έκφρασης (t₀) και κατά τη διάρκεια αυτής (t₂=2h, t₄=4h, t₆=6h). Ως μάρτυρες σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιούνταν βακτηριακά κύτταρα τα οποία έφεραν τους μη ανασυνδυασμένους φορείς. Σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αναλύονταν τα βακτηριακά κύτταρα αφού πρώτα επαναδιαλύονταν σε Sonication buffer. Επίσης για την εκτίμηση των μοριακών βαρών των αναλυόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών για πρωτεΐνες. Η οπτικοποίηση των αναλυμένων πρωτεϊνών γινόταν με χρώση Coomassie Brilliant Blue R-250.

➤ Πρωταρχικό βήμα ήταν να γίνει έλεγχος αν το γονίδιο *CYP71A-Olea* κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν από τα βακτηριακά κύτταρα 2ώρες μετά από την επαγωγή της έκφρασης με 1mM IPTG. Από την στιγμή που διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται είναι σκόπιμο να ελεγχθεί αν είναι υδατοδιαλυτή ή παραμένει στο ίζημα. Επομένως η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

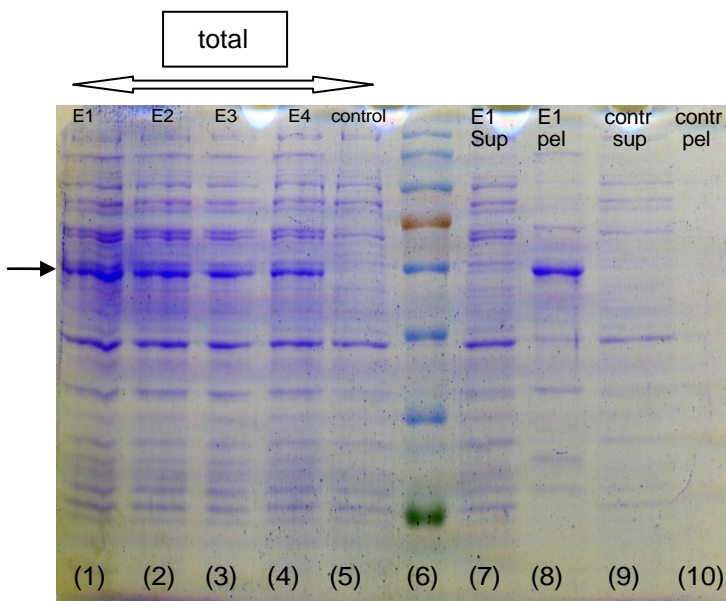
- Για κάθε έναν από τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς pET28a και pQE30, που είχαν μετασχηματιστεί στα κύτταρα έκφρασης BL21 και XL1 αντίστοιχα, επιλέχθηκαν τέσσερα δείγματα τα οποία επαναδιαλύθηκαν σε 250μl Sonication buffer, προστέθηκε σε αυτά 2x loading buffer, επώαστηκαν για 10λεπτά στους 80°C και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%.

- Επιπλέον επιλέχθηκε ένα από τα τέσσερα αυτά δείγματα και μέσω υπέρηχων έσπασαν τα βακτηριακά κύτταρα (διατηρώντας άθικτες τις πρωτεΐνες), και το δείγμα μετά από φυγοκέντριση χωρίστηκε σε ίζημα και υπερκείμενο. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (επαναδιάλυση του ιζήματος σε 250μl Sonication buffer, προσθήκη 2x loading buffer σε όλα τα δείγματα και επώαση αυτών για 10λεπτά στους 80°C) τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Στο ίδιο πήκτωμα αναλύθηκε και ένα δείγμα μάρτυρας για την κάθε περίπτωση, δηλαδή τα βακτηριακά κύτταρα που έφεραν μόνο τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς το γονίδιο.

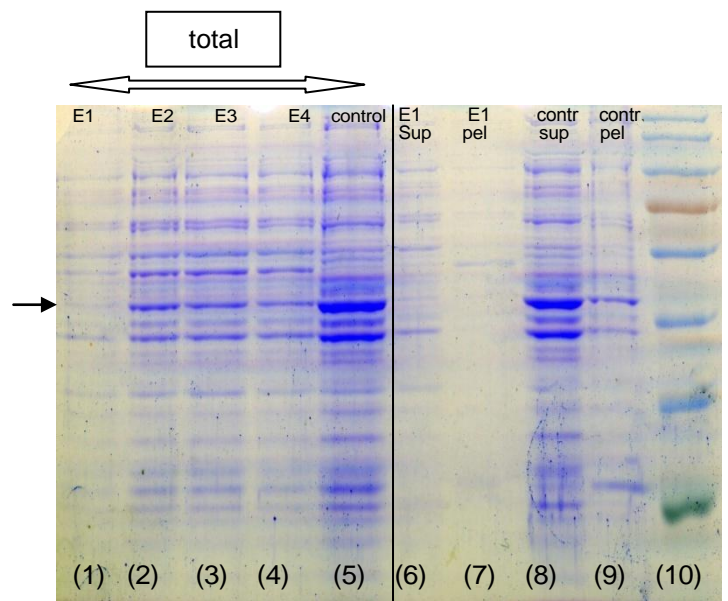


Το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης είναι 63kDa στον pET28a και 60kDa στον pQE30.

Εικ. 42: protein marker. *BlueStar Prestained ProteinMarker, Nippon Genetics.*



Εικ. 43: pET28a+cyp71a. Στις τέσσερις πρώτες στήλες οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στα βακτηριακά κύτταρα χωρίς αυτά να υποστούν διάσπαση(sonication). (5) δείγμα-μάρτυρας, πρωτεΐνες που εκφράζονται στα ίδια βακτηριακά κύτταρα όταν δεν έχει προηγηθεί ανασυνδυασμός του πλασμιδίου με το γονίδιο *CYP71A*. (6)protein marker. Μετά από την διάσπαση των βακτηριακών κυττάρων, το πρώτο δείγμα(E1) διαχωρίστηκε σε υπερκείμενο(7) και σε ίζημα (8), και οι αντίστοιχοι μάρτυρες αυτών, τα βακτηριακά κύτταρα μόνο με τους άδειους φορείς (9), (10). Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε 10% πηκτική πολυακρυλαμίδης.

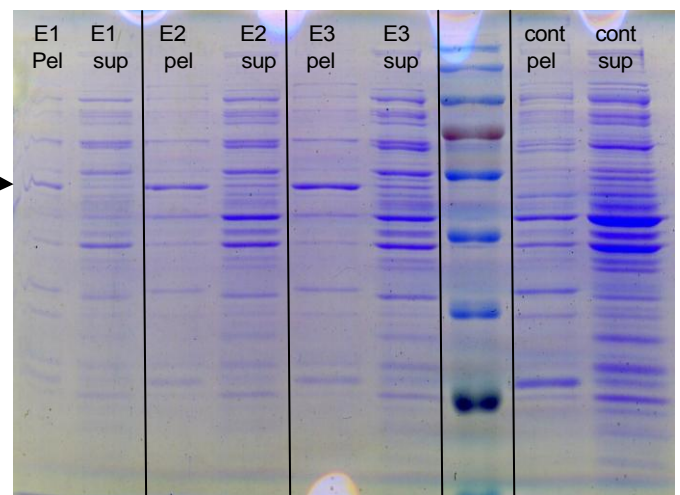
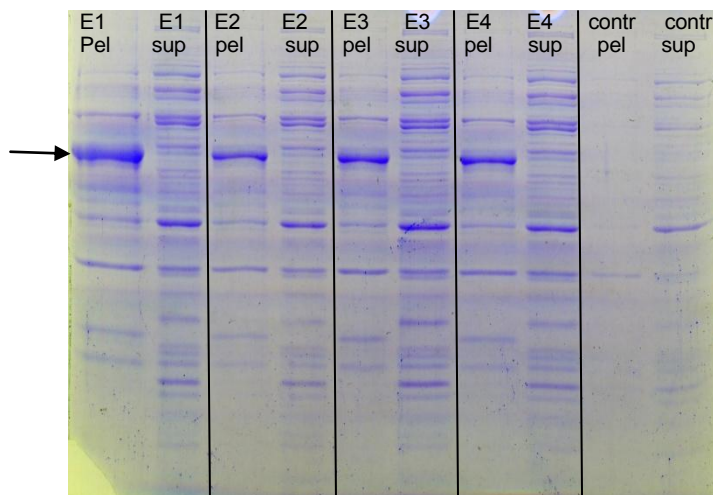


Εικ. 44: pQE30+cyp71a. Στις τέσσερις πρώτες στήλες οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στα βακτηριακά κύτταρα χωρίς αυτά να υποστούν διάσπαση(sonication).(5) δείγμα-μάρτυρας,βακτηριακά κύτταρα μόνο με τους άδειους φορείς. Μετά από την διάσπαση των βακτηριακών κυττάρων, το πρώτο δείγμα(E1) διαχωρίστηκε σε υπερκείμενο(6) και σε ίζημα (7), και τα αντίστοιχα δείγματα-μάρτυρες, τα βακτηριακά κύτταρα μόνο με τους άδειους φορείς (8),(9). (10) *protein marker*. Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε 10% πηκτική πολυακρυλαμίδης.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 43, τα πρότυπα έκφρασης στα τέσσερα πρώτα δείγματα δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Η αναμενόμενη ζώνη, στα 63kDa, που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη CYP71A-Olea φαίνεται να υπάρχει στα τέσσερα πρώτα δείγματα όπου τα βακτηριακά κύτταρα δεν είχαν διασπαστεί, ενώ αντίθετα στο δείγμα-μάρτυρα (μόνο ο φορέας, χωρίς το γονίδιο CYP71A) φαίνεται να μην υπάρχει μάλιστα στο ίδιο μέγεθος. Επιπλέον επιθυμητή ζώνη ίδιου μεγέθους και υψηλής σχετικά έντασης παρατηρείται στο ίζημα του δείγματος E1 ενώ αντίστοιχη ζώνη δεν παρατηρείται ούτε στο υπερκείμενο αλλά ούτε και στα δείγματα-μάρτυρες.

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και στην περίπτωση του πλασμιδιακού φορέα pQE30 (εικ 44). Στην περίπτωση αυτή η αναμενόμενη ζώνη κυμαίνεται στα 60kDa και παρατηρείται στα δείγματα στα οποία τα βακτηριακά κύτταρα παρέμειναν άθικτα (E1- E4) και στο ίζημα του δείγματος E1, ενώ στα δείγματα-μάρτυρες δεν φαίνεται ξεκάθαρα να υπάρχει αντίστοιχη ζώνη.

- Για να διαπιστωθεί αν πράγματι η ζώνη που αντιστοιχεί στο μέγεθος της πρωτεΐνης CYP71A-Olea παρατηρείται μόνο στο ίζημα και όχι στο υπερκείμενο, αναλύθηκαν όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα αφού αρχικά διασπάστηκαν τα βακτηριακά κύτταρα.

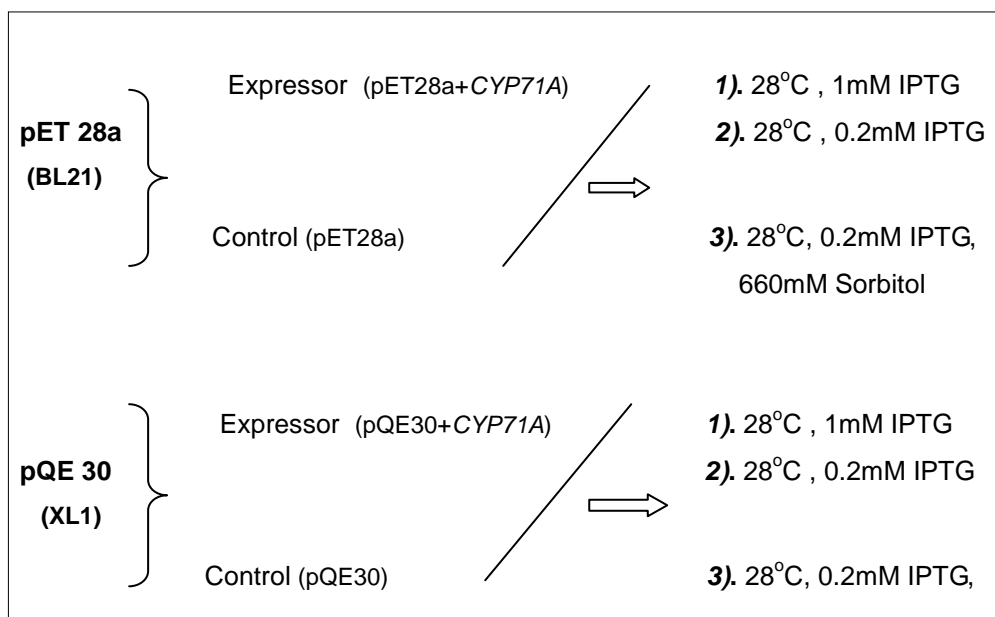


Εικ. 45: pET28a+cyp71a Ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στο ίζημα και στο υπερκείμενο του κάθε δείγματος (E1 έως E4) μετά από την διάσπαση των βακτηριακών κυττάρων BL21 που περιέχουν το πλασμίδιο pET28a+cyp71a. Στις δύο τελευταίες στήλες τα αντίστοιχα δείγματα-μάρτυρες (περιέχουν μόνο το φορέα pET28a). Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10%.

Εικ. 46: pQE30+cyp71a Ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στο ίζημα και στο υπερκείμενο του κάθε δείγματος (E1 έως E3) μετά από την διάσπαση των βακτηριακών κυττάρων XL1 που περιέχουν το πλασμίδιο pQE30+cyp71a. Στις δύο τελευταίες στήλες τα αντίστοιχα δείγματα-μάρτυρες (περιέχουν μόνο το φορέα pQE30). Ηλεκτροφόρηση 20μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10%.

Όπως παρατηρείται στις παραπάνω εικόνες ηλεκτροφόρησης, η ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη CYP71A-Olea είναι εμφανής μόνο στο ίζημα του κάθε δείγματος και όχι στο υπερκείμενο με αποτέλεσμα να μην καθίσταται υδατοδιαλυτή.

- Άρα σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα και τις εικόνες ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης, η πρωτεΐνη CYP71A-Olea εκφράζεται στα βακτηριακά κύτταρα BL21 και XL1 αλλά δεν είναι υδατοδιαλυτή. Ακολούθησαν διάφορες δοκιμές σχετικά με τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών καλλιεργειών με σκοπό να αυξηθεί το ποσοστό της πρωτεΐνης στο υδατοδιαλυτό κλάσμα ώστε να μπορεί να απομονωθεί καθαρή και λειτουργική. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, όπως παρουσιάζονται και στο σχήμα που ακολουθεί:

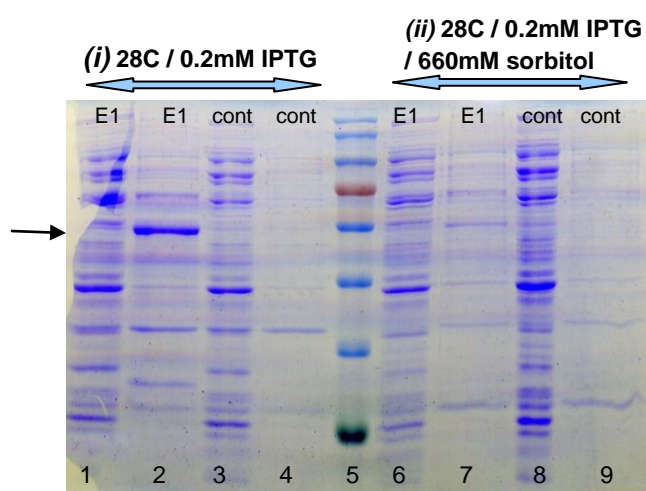


Επομένως αφού τα κύτταρα αναπτύχθηκαν ο.π. στους 28°C, μικρή ποσότητα αυτών (50μl) μόλυναν νέα καλλιέργεια (10ml). Όταν οι βακτηριακές καλλιέργειες αποκτούσαν οπτική πυκνότητα O.D. = 0.4-0.5 γινόταν προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM ή 0.2mM, ανάλογα την συνθήκη που εφαρμοζόταν. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την εφαρμογή της συνθήκης (3) τα βακτηριακά κύτταρα είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο στο οποίο είχε ήδη προστεθεί σορβιτόλη σε τελική συγκέντρωση 660mM.

- Για την κατασκευή pET28a+CYP71A (Expressor) και τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pET28a (Control), στα βακτηριακά κύτταρα BL21, λήφθηκαν δείγματα στους εξής χρόνους: t_0 (μόλις η οπτική πυκνότητα των κυττάρων έφτασε O.D. = 0.4-0.5 προστέθηκε αμέσως σε αυτά IPTG), $t_2 = 2h$ (δύο ώρες μετά από την προσθήκη IPTG και την επαγωγή της έκφρασης), $t_4 = 4h$ (τέσσερις ώρες μετά από την προσθήκη IPTG και την επαγωγή της έκφρασης) και $t_6 = 6h$ (έξι ώρες μετά από την προσθήκη IPTG και την επαγωγή της έκφρασης). Και οι τέσσερις χρόνοι δειγματοληψίας λήφθηκαν για την πρώτη και την δεύτερη συνθήκη ανάπτυξης ενώ για την τρίτη συνθήκη λήφθηκαν δείγματα σε t_0 , $t=2h$ και $t=4h$.
- Για την κατασκευή pQE30 +CYP71A (Expressor) και τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pQE30 (Control), στα βακτηριακά κύτταρα XL1, λήφθηκαν οι ίδιοι χρόνοι δειγματοληψίας όπως αναφέρθηκαν και στην προηγούμενη παράγραφο και για τις δύο πρώτες συνθήκες ανάπτυξης. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας στα XL1 κύτταρα πραγματοποιήθηκε σε αργούς ρυθμούς, σε σύγκριση με την αντίστοιχη ανάπτυξη των καλλιεργειών στα BL21 κύτταρα, με αποτέλεσμα να μην παρθούν δείγματα για την τρίτη συνθήκη κατά την οποία η παρουσία της

σορβιτόλης ως οσμωτικός παράγοντας δυσχεραίνει σε μεγαλύτερο βαθμό την ανάπτυξη των βακτηρίων.

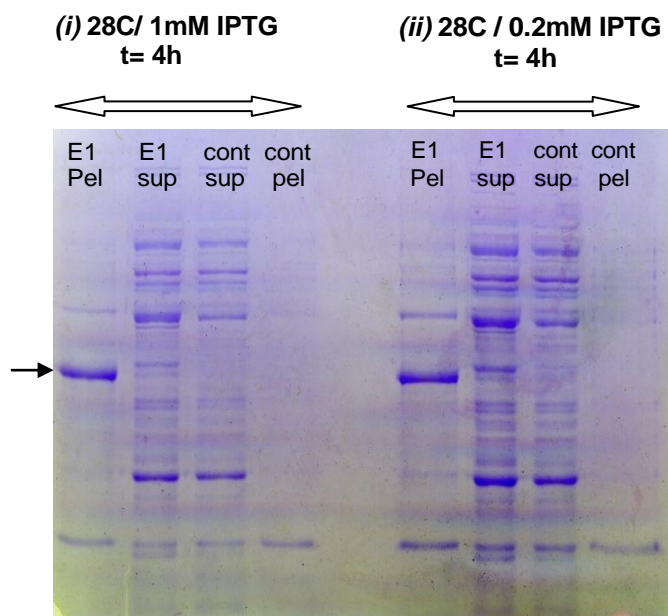
Και στα παρακάτω δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμίδα η διαδικασία προετοιμασίας τους ήταν η εξής: επαναδιάλυση των δειγμάτων σε Sonication buffer, διάσπαση των βακτηριακών κυττάρων BL21/pET28a-CYP71A, BL21/pET28a, XL1/pQE30-CYP71A και XL1/pQE30 μέσω υπερηχων, φυγοκέντριση ώστε να γίνει ο διαχωρισμός του κάθε δείγματος σε ίζημα και υπερκείμενο, προσθήκη 2x loading buffer, επώαση για 10' στους 80C και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης



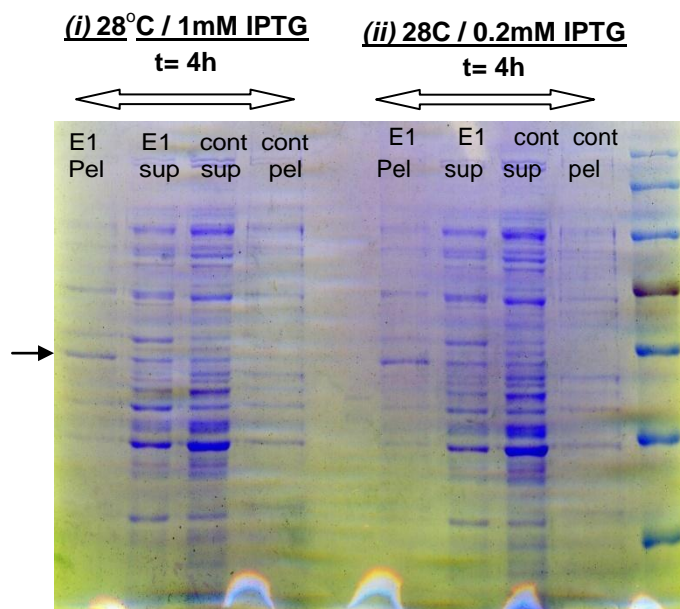
Εικ. 47: pET28a (1-4, 6-9) το πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε υπερκείμενο και ίζημα των δειγμάτων Expressor(pET28a+CYP71A) και Control (pET28a), μετά από 4h από την επαγωγή της έκφρασης με 0.2mM IPTG. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών έγινε στους 28C, ενώ στα δείγματα (6-9) έχει προστεθεί και 660mM σορβιτόλης. Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε πήκτη SDS-πολυακρυλαμίδης 10%.

Στην εικόνα 47 παρά το γεγονός ότι άλλαξαν οι συνθήκες ανάπτυξης των καλλιεργειών, η ζώνη στα 63kDa που αντιπροσωπεύει το μέγεθος της παραγόμενης πρωτεΐνης CYP71A-Olea είναι εμφανής μόνο στο ίζημα και στις δύο διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Στην πρώτη συνθήκη (i) όμως η ζώνη είναι μεγαλύτερης έντασης συγκριτικά με την αντίστοιχη στην δεύτερη συνθήκη (ii).

Επαναλήφθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (Expressor και Control) που λήφθηκαν 4ώρες (t=4h) μετά από την προσθήκη IPTG (1mM ή 0.2mM) και την ανάπτυξη των καλλιεργειών στους 28°C και για τους δύο πλασμιδιακούς φορείς, pET28a και pQE30.



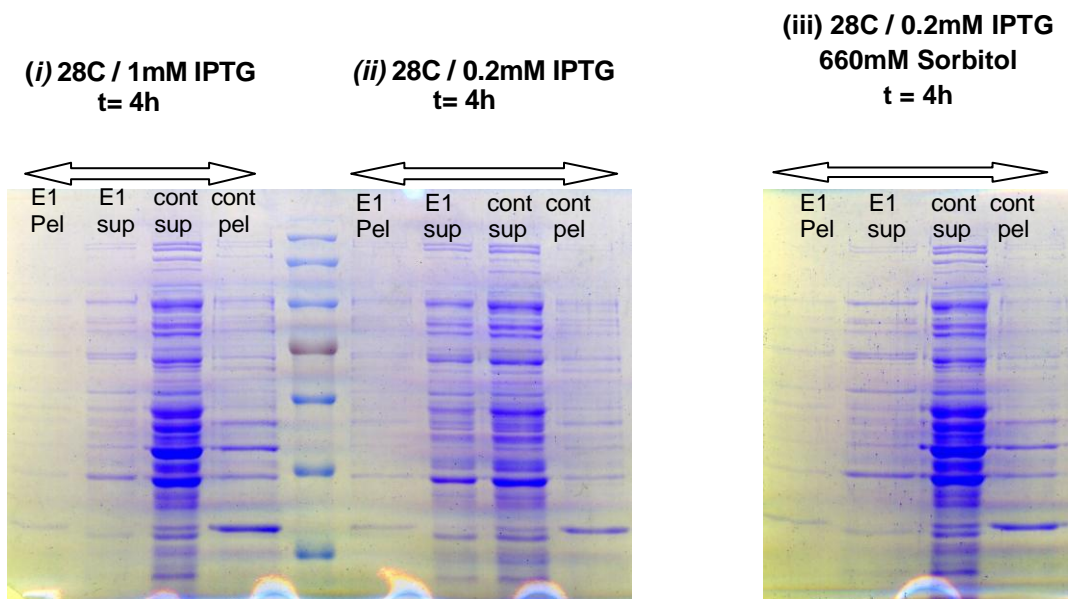
Εικ. 48: pET28a το πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε υπερκείμενο και ίζημα των δειγμάτων Expressor(pET28a+CYP71A) και Control (pET28a), σε δύο διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%.



Εικ. 49: pQE30 το πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε υπερκείμενο και ίζημα των δειγμάτων Expressor(pQE30+CYP71A) και Control (pQE30), σε δύο διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%.

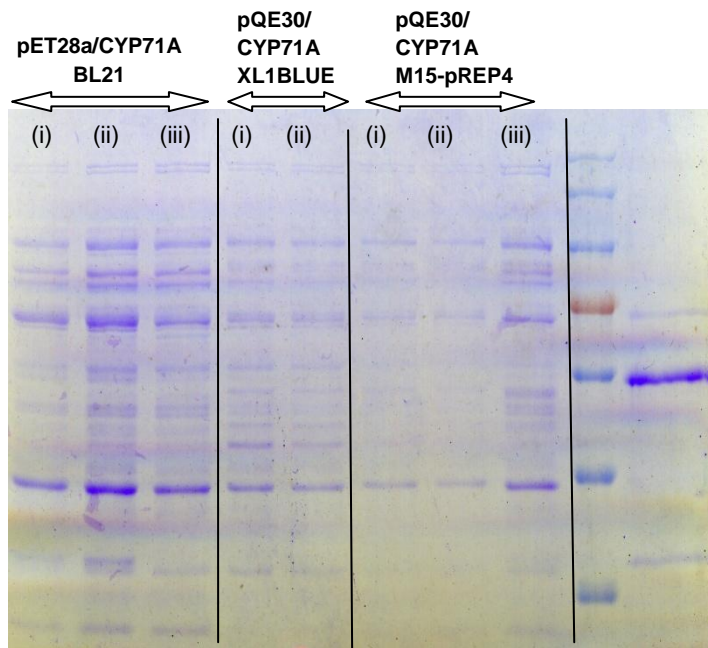
Στις εικόνες 48 και 49 επιλέχθηκε να γίνει η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8% έτσι ώστε να ληφθεί μια πιο λεπτομερής εικόνα στην οποία θα είναι πιο ξεκάθαρη η επιθυμητή ζώνη. Και σε αυτές τις εικόνες η επιθυμητή ζώνη υπερισχύει στο ίζημα. Μειώνοντας λοιπόν την συγκέντρωση του πηκτώματος θέλαμε να ελέγξουμε αν στο αντίστοιχο μέγεθος φαίνεται κάποια ζώνη στο υπερκείμενο αλλά και στα δείγματα-μάρτυρες.

- Τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα XL1 με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pQE30/CYP71A αναπτύχθηκαν αργά όπως επίσης αργή υπήρξε και η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών. Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pQE30/CYP71A στα βακτηριακά κύτταρα M15-pREP4. Σε αντίθεση λοιπόν με τα XL1 κύτταρα, η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας μέχρις ότου να παρουσιάσουν οπτική πυκνότητα O.D.= 0,4-0,5 ήταν πιο γρήγορη. Και στα κύτταρα αυτά εφαρμόστηκαν οι τρεις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα της παραγωγής πρωτεϊνών σε ίζημα και υπερκείμενο από τα δείγματα: Expressor και Control παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%.



Εικ 50: το πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε υπερκείμενο και ίζημα των δειγμάτων Expressor(pQE30+CYP71A) και Control (pQE30), στις τρεις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων M15-pREP4. Ηλεκτροφόρηση 15μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%.

- Με σκοπό να διαπιστωθεί αν η ζώνη που παρατηρείται στο ίζημα (pellet) στα 60kDa για το pQE30-CYP71A και στα 63kDa για το pET28A-CYP71A , σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων, υπάρχει και παράγεται η αντίστοιχη πρωτεΐνη ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western. Επιπρόσθετος σκοπός ήταν να ελεγχθεί η περίπτωση να υπάρχει η επιθυμητή πρωτεΐνη στο υπερκείμενο αλλά να μην φαίνεται. Έτσι λοιπόν κατά την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν όλα τα δείγματα- supernatant των κατασκευών pET28a/ CYP71A και pQE30/CYP71A (Expressors) σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων BL21, XL1 και M15-pREP4 και ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα- pellet διότι σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν εμφανής η επιθυμητή ζώνη στα δείγματα pellet. Παρακάτω παρουσιάζονται τα δείγματα που αρχικά ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%.



Εικ.51: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%.

(i)28⁰C, 1m M IPTG

(ii)28⁰C, 0.2m M IPTG

(iii)28⁰C, 0.2m M IPTG, 660m M Sorbitol

Στην τελευταία στήλη ο θετικός μάρτυρας:

(pET28a/CYP71A)-0.2 mM IPTG- pellet

- Έγινε αρχικά μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF, η οποία στη συνέχεια επώαστηκε με πρωτογενές αντίσωμα αντι- His ποντικού (mouse anti-His) και δευτερογενές αντίσωμα (Goat Anti-mouse) που αναγνώριζε το πρωτογενές και προσδενόταν σε αυτό. Το δευτερογενές αντίσωμα ανιχνευόταν με αντίδραση χημειοφωταύγειας δεδομένου ότι ήταν σε αυτό συζευγμένη η υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish peroxidase, HPR) και η αποτύπωση των αποτελεσμάτων γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ.

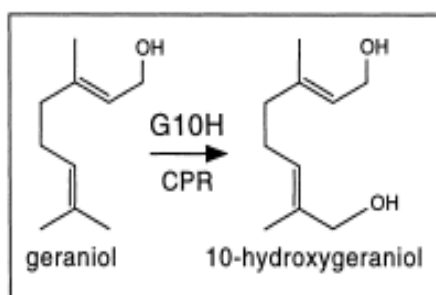
Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη PVDF έγινε με επιτυχία, όμως σήμα δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν. Φαίνεται πως η ετερόλογη έκφραση στα βακτήρια δεν καθίσταται εφικτή και πιθανώς να χρειάζονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν από το βακτήριο. Επιπλέον πιθανό θεωρείται και το γεγονός η πρωτεΐνη να είναι τοξική για τα βακτηριακά κύτταρα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται έγκλειστα σωματίδια.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ένζυμο *G10H* αποτελεί ένα κυτόχρωμα P450- μονοξυγονάση, που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των ιριδοειδών και αρκετών κλάσεων των μονοτερπενοειδών αλκαλοειδών, που εντοπίζονται σε μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών. Το ένζυμο *G10H* υδροξυλιώνει το μονοτερπένιο γερανιόλη στο C-10 οδηγώντας στον σχηματισμό της 10-υδροξυγερανιόλης, αντίδραση που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί το πρώτο βήμα σχηματισμού των ιριδοειδών (Collu *et al.*,2001).



Εικ.52: Η υδροξυλίωση του μονοτερπενίου γερανιόλης στο 10ο άτομο άνθρακα, από το ένζυμο της υδροξυλάσης της 10-γερανιόλης (*G10H*), προς 10-υδροξυγερανιόλη. CPR, το ένζυμο της NADPH-κυτοχρωμικής P 450.

Τα ιριδοειδή είτε συσσωρεύονται ως τελικά προϊόντα είτε μεταβολίζονται περαιτέρω σχηματίζοντας διάφορες κλάσεις των ινδολαλκαλοειδών. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο φυτό *Catharanthus roseus* έδειξαν ότι περιοριστικός παράγοντας στη συσσώρευση των ινδολαλκαλοειδών αποτελεί η βιοσύνθεση της σεκολογγανίνης. Άρα πιθανό σημείο ελέγχου στη σύνθεση της σεκολογγανίνης θεωρήθηκε η καταλυτική δράση του ενζύμου *G10H* το οποίο δρα στην πρώτη αντίδραση του μονοπατιού (Irmeler *et al.*,2000).

Αυτή η πιθανή ρυθμιστική επίδραση του ενζύμου *G10H* στο μονοπάτι παραγωγής των αλκαλοειδών και πιθανότατα στο αντίστοιχο- παράλληλο της σεκολογγανίνης- στα *Oleaceae*, που επίσης ξεκινά με τη γερανιόλη καθιστά αναγκαία την εύρεση ενός cDNA κλώνου που θα διευκολύνει τη μελέτη της έκφρασης και της δραστηριότητας του ενζύμου, με απώτερο σκοπό τη διαλεύκανση της ρυθμιστικής του επίδρασης.

Παρακάτω παρουσιάζονται περιληπτικά οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα φυτικά είδη σχετικά με την απομόνωση του γονιδίου *G10H* και την καταλυτική δράση του αντίστοιχου ενζύμου.

➤ *Catharanthus roseus*, CYP76B6

Η πρώτη επιτυχής προσπάθεια απομόνωσης του γονιδίου *G10H* συντελέστηκε από τους Collu *et al.* (2001) στο *Catharanthus roseus* αφού κατέστη δυνατή για πρώτη φορά η απομόνωση, ο καθαρισμός και η αλληλούχιση του ενζύμου. Μετά τη σάρωση και την ενίσχυση της cDNA βιβλιοθήκης απομονώθηκε cDNA κλώνος που κωδικοποιεί πρωτεΐνη μοριακού βάρους 53kDa, τυπικό για φυτικό CYP450 (47-57 kDa). Με αμινοξική ομολογία >50% εντάχθηκε στην υποοικογένεια 76B και ονομάστηκε CYP76B6. Επίσης ετερόλογη έκφραση σε καλλιέργεια κυττάρων του *Catharanthus roseus* καθώς και σε ζύμη έδειξε ότι η πρωτεΐνη καταλύει την υδροξυλίωση της γερανιόλης και της ισομερούς της νερόλης στη θέση του C-10.

➤ *Arabidopsis thaliana*, CYP76C1

Μέσω της PCR τεχνικής απομονώθηκαν πολλαπλά cDNA από το φυτό *Arabidopsis thaliana* που κωδικοποιούν κυτοχρώματα P450. Μια από τις κωδικοποιημένες πρωτεΐνες που ανήκει στην οικογένεια 76 και ονομάστηκε CYP76C1, κατά την ετερόλογη έκφραση της σε βακίλιό αποδείχθηκε η ικανότητα υδροξυλίωσης της γερανιόλης. Το παράδοξο έγκειται στην ύπαρξη του ενζύμου *G10H* στο *Arabidopsis thaliana*, φυτό που δεν παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες προερχόμενους από τα ιριδοειδή. Πιθανή εξήγηση θεωρήθηκε η υδροξυλίωση της γερανιόλης από το CYP76C1 που αποδεικνύεται *in vitro* να μην αποτελεί και τη φυσιολογική *in vivo* λειτουργία του (Mizutani *et al.*, 1998; W Xu *et al.*, 2001)

➤ *Swertia mussotii*, CYP76B10

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολόκληρου του cDNA κλώνου (*SmG10H*) από το φυτό και η αμινοξική ακολουθία παρουσίαζε υψηλό βαθμό ομολογίας με μέλη της οικογένειας 76 καθώς επίσης και ομολογία 80,2% με το αντίστοιχο γονίδιο υδροξυλάσης της γερανιόλης, *CrG10H*, στο *Catharanthus roseus*. Το γονίδιο αυτό κατατάχθηκε στην υποοικογένεια 76B και ονομάστηκε *CYP76B10*. Στη συνέχεια η ετερόλογη έκφραση που πραγματοποιήθηκε σε ζύμη και σε βακτήρια έδειξε την καταλυτική δράση της υδροξυλίωσης επί γερανιόλης (Wang *et al.*, 2010).

Με βάση τις παραπάνω αναφορές δικαιολογείται το γεγονός πως το ένζυμο υδροξυλάση της 10-γερανιόλης συγκαταλέγεται στην υποοικογένεια των CYP76B των φυτικών κυτοχρωμάτων.

➤ *Olea europaea*- OeGE10H

Η ερευνητική ομάδα των Alagna *et al.* (2012) μελέτησαν την έκφραση 35 γονιδίων που προσδιορίστηκαν από τις ακολουθίες EST και μέσω της ανάλυσης cDNA- AFLP, είναι πιθανό να κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται σε βιοσυνθετικά μονοπάτια δευτερογενών μεταβολιτών (Alagna *et al.*, 2009; OLEA EST database). Τα υποψήφια αυτά γονίδια χαρακτηρίστηκαν μέσω της ανάλυσης RT-qPCR. Ένα από αυτά τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν και το γονίδιο *OeGE10H* που προτείνεται ότι κωδικοποιεί το ένζυμο υδροξυλάση της 10-γερανιόλη.

Πρέπει να σημειωθεί πως τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των σεκοιριδοειδών στην ελιά δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί διότι συντίθενται σε έναν περιορισμένο αριθμό φυτικών ειδών των οποίων οι ακολουθίες των γονιδιωμάτων τους δεν είναι ακόμη διαθέσιμες. Έτσι λοιπόν είναι δυνατόν να μελετηθούν κάποιες από τις ενζυμικές λειτουργίες τους μελετώντας προτεινόμενα βιοσυνθετικά μονοπάτια που συμβαίνουν παράλληλα σε χαρακτηρισμένα φυτικά είδη όπως για παράδειγμα το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ινδολαλκαλοειδών στο *Catharanthus roseus*.

Συνοψίζοντας, διαπιστώνεται πως το γονίδιο *OeGE10H* στην ελιά δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί από τη στιγμή που στη συγκεκριμένη δημοσίευση (Alagna *et al.*, 2012). παρουσιάζεται ένα τμήμα του μόνο και επιπλέον με την πραγματοποίηση ετερόλογης έκφρασης θα επιβεβαιωθεί η καταλυτική δράση του ενζύμου επί της γερανιόλης.

Δυσκολίες που χαρακτηρίζουν την τάξη των CYP 450 ενζύμων και κατά συνέπεια και την απομόνωση του ενζύμου G10H:

- Ο μεγάλος αριθμός συγγενών γονιδίων ανά είδος,
- Η έντονη λειτουργική παραλλακτικότητα
- Το χαμηλό ποσοστό ομολογίας των γονιδίων-μελών των διαφόρων οικογενειών P 450
- Ο εξαιρετικά δύσκολος καθαρισμός των πρωτεϊνών, λόγω της μικρής περιεκτικότητάς τους στους φυτικούς ιστούς και της περιορισμένης σταθερότητας τους σε διαδικασίες διαλυτοποίησης.

Σε προηγούμενη πτυχιακή μελέτη, είχε πραγματοποιηθεί η απομόνωση μέρους του γονιδίου *P450* της ελιάς μέσω της τεχνικής του εκφυλισμένου RT-PCR, με τον σχεδιασμό εκφυλισμένων εκκινητών από συντηρημένες περιοχές μελών της υποοικογένειας 71 A των φυτικών κυτοχρωμάτων P450.

Προϋπάρχουσες μελέτες για την απομόνωση CYP 450 μέσω PCR, απέδειξαν ότι ο σχεδιασμός πολύ εκφυλισμένων εκκινητών από συντηρημένες περιοχές οδηγεί στην απομόνωση μιας πληθώρας διαφορετικών *P450* γονιδίων, για την απομόνωση ολόκληρης της ακολουθίας των οποίων απαιτείται η σάρωση βιβλιοθηκών, οδηγώντας τελικά στη απομόνωση ενός αριθμού ολόκληρων cDNA κλώνων από διαφορετικές οικογένειες και με άγνωστη φυσιολογική λειτουργία. Η προσέγγιση κατευθύνθηκε σε μια και μόνο οικογένεια CYP 450, για κατά το δυνατόν εξειδίκευση των εκφυλισμένων εκκινητών, η επιλογή της οποίας στηρίχθηκε σε προϋπάρχουσες μελέτες και βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με το ένζυμο της G10H.

Η τεχνική αυτή απέδωσε ένα κεντρικό τμήμα 573 βάσεων, το οποίο αντιστοιχεί σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 191 αμινοξέων, εμφανίζοντας ομολογία 36-47% με μέλη της οικογένειας 71, ποσοστό αρκετά ικανοποιητικό καθώς η ένταξη των P450 σε οικογένειες γίνεται με αμινοξική ομολογία >40%. Στα πλαίσια της ίδιας μελέτης σχεδιάστηκαν επίσης και εξειδικευμένοι εκκινητές για τη στόχευση του 5' και 3' άκρου του γονιδίου, με τη τεχνική του RACE-PCR. Οι αντιδράσεις του 5' RACE παρήγαγαν ένα τμήμα 510 βάσεων, που αντιστοιχεί σε αναγνωστικό πλαίσιο 149 αμινοξέων παρουσιάζοντας ομολογία 59-70% με μέλη της υποοικογένειας 71A. Επίσης η περιοχή επικάλυψης με το κεντρικό τμήμα εμφάνιζε πλήρη ομολογία. Μέσω του 3' RACE απομονώθηκαν δύο κλώνοι, η αλληλούχιση των οποίων δεν έδειξε τα επιθυμητά αποτελέσματα, με συνέπεια να μην χαρακτηριστεί πλήρως το cDNA του γονιδίου.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ως πρωταρχικό στόχο υπήρξε ο πλήρης μοριακός χαρακτηρισμός του γονιδίου της ελιάς *CYP71A* με την εύρεση της αλληλουχίας του 3' άκρου του γονιδίου μέσω της τεχνικής 3'RACE-PCR, ώστε να χαρακτηριστεί επιτυχώς το πλήρες cDNA του γονιδίου. Από το κεντρικό τμήμα καθώς και από την 5' περιοχή του γονιδίου σχεδιάστηκαν ορθοί εκκινητές όπου ο κάθε ένας συνδυάστηκε με τον ανάστροφο εκκινητή oligo-dT στις αντιδράσεις PCR και το κάθε ζεύγος εκκινητών έδωσαν ζώνη αναμενόμενου μεγέθους. Επιλέχθηκαν δύο δείγματα με υψηλό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους και με πλήρη ομολογία στην περιοχή κάλυψης με το κεντρικό τμήμα. Για να βεβαιωθεί αν αυτά τα δύο γονίδια είναι διαφορετικά ή πρόκειται για αλληλόμορφα σχεδιάστηκαν ένας κοινός ορθός εκκινητής από την 5' αμετάφραστη περιοχή και δύο διαφορετικοί ανάστροφοι από την 3' αμετάφραστη περιοχή όπου δεν φέρουν συντηρημένες μεταξύ τους ακολουθίες. Οι 5' και 3' UTR αποτελούν περιοχές των γονιδίων που δεν είναι συντηρημένες μεταξύ των μελών μιας οικογένειας γονιδίων. Τελικά δείχθηκε πως είναι το ίδιο γονίδιο και

πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ολόκληρου του γονιδίου με εξειδικευμένους εκκινητές. Πρόκειται για γονίδιο 1647 βάσεων που αντιστοιχεί σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 1524 βάσεων και 508 αμινοξέων. Η εισαγωγή της πλήρους νουκλεοτιδικής ακολουθίας στο πρόγραμμα blastx για τη μετάφραση νουκλεοτιδικών ακολουθιών και την εύρεση ομολόγων σε πρωτεϊνικό επίπεδο έδωσε κατά κύριο λόγο ομόλογα γονίδια που κατατάσσονται στην υποοικογένεια 71 A των φυτικών κυτοχρωμάτων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα μέλη της υποοικογένειας 71 A των φυτικών κυτοχρωμάτων P450 εμπλέκονται κυρίως στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων σε διάφορα φυτικά είδη.

Το γονίδιο *CYP71A* της ελιάς που απομονώθηκε φέρει το υψηλότερο ποσοστό ομολογίας με τα γονίδια *CYP71A5* (77%) και *CYP71A6* (74%) του φυτού *Nepeta racemosa*. Η εμπλοκή του *CYP71A5* στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων, πιθανώς ως G10H, συμπεραίνεται από τα πρότυπα έκφρασης των φύλλων του φυτού σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Παρ' όλα αυτά η ενζυμική δραστηριότητα δεν έχει αποδειχθεί με ετερόλογη έκφραση και παραμένει άγνωστη (Clark *et al.*, 1996).

Η ανάλυση κατά Southern έδειξε την ύπαρξη ενός πολύ κοντινού σε ομολογία γονιδίου (*CYP71A1-related*) με το *CYP71A1* του αβοκάντο (*Persea americana*), στα φύλλα του φυτού *Nepeta racemosa* και δείχθηκε, μέσω ετερόλογης έκφρασης σε ζύμη, ότι καταλύει την υδροξυλίωση της γερανιόλης και της νερόλης στο C-10, ενώ το ένζυμο *CYP71A1* του αβοκάντο καταλύει 2,3- ή 6,7-εποξειδωση στα ίδια υποστρώματα (Hallahan *et al.*, 1994).

Σύμφωνα με τις παραπάνω δημοσιευμένες μελέτες είναι πιθανό τα μέλη της υποοικογένειας CYP 71A, όπως το *CYP71A5* και το *CYP71A1-related*, των φυτικών κυτοχρωμάτων να δρουν καταλυτικά επι της γερανιόλης, όπως συμβαίνει με τα μέλη της υποοικογένειας CYP 76B, αλλά απαιτείται περαιτέρω μελέτη μέσω ετερόλογης έκφρασης για να αποδειχθεί η δράση αυτή.

Επιπλέον ομόλογα γονίδια της υποοικογένειας *CYP71A* που εμφανίστηκαν στα αποτελέσματα του blastx είναι τα ακόλουθα:

➤ *CYP71A2,3 and 4 - Solanum melongena*

Οι πρωτεΐνες αυτές πιθανολογείται να παίζουν κάποιο ρόλο στην ωρίμανση, όπως ο σχηματισμός αρώματος ή γήρανση των ιστών. Παρόλα αυτά η λειτουργία των παραπάνω ενζύμων δεν έχει ακόμη αποδειχθεί (Umamoto *et al.*, 1993).

➤ Menthofuran synthase: CYP71A32 - *Mentha piperita*

Το μονοτερπένιο μενθοφουράνιο (menthofuran) είναι ένα κοινό συστατικό του αιθέριου ελαίου μέντας και προέρχεται από την ένωση pulegone. Η συνθάση του μενθοφουρανίου καταλύει τη μετατροπή της πουλεγγόνης [(+)-pulegone] σε μενθοφουράνη [(+)-menthofuran] μέσω υδροξυλίωσης. (Berthea *et al.*, 2001)

➤ Furanocoumarin synthesis: CYP71AJ1 and CYP71AJ4

Οι φουρανοκουμαρίνες είναι φαινυλοπροπανοειδείς ενώσεις που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας ομάδας φουρανίου συνδεδεμένου με ένα βενζοπυράνιο. Ανάλογα με την θέση του υποκαταστάτη του φουρανίου διακρίνονται οι ενώσεις psoralen και angelicin. Η μετατροπή της ένωσης marmesin προς psoralen καταλύεται από την μονοξυγονάση CYP71AJ1 του φυτού *Ammi majus* (Larbat *et al.*, 2007). Το κυτόχρωμα CYP71AJ4 που απομονώθηκε από το φυτό *Pastinaca sativa* και παρουσιάζει αμινοξική ομολογία 70% με το CYP71AJ1, ταυτοποιήθηκε ως συνθάση της ένωσης angelicin (Larbat *et al.*, 2009).

Στη συνέχεια του πειραματικού και με στόχο την παραγωγή και την απομόνωση της πρωτεΐνης επιλέχθηκε να εκφραστεί σε βακτήρια *E. coli*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ετερόλογης έκφρασης σε βακτήρια, των φορέων έκφρασης pET και pQE, τα οποία χρησιμοποιούν ως επαγωγικό μέσο IPTG και παράγουν πρωτεΐνες συντηγμένες με την ουρά των βιστιδινών στο άμινο ή/και κάρβοξυ άκρο αυτών.

Απώτερος σκοπός ήταν η υπερπαραγωγή της εν λόγω πρωτεΐνης και έπειτα η απομόνωση της για τη χρησιμοποίηση αυτής σε πειράματα δραστηκότητας και υποστρωματικής διαφοροποίησης. Για την εύκολη απομόνωση αυτής από το σύνολο των βακτηριακών πρωτεϊνών, η ένθεση έπρεπε να τοποθετηθεί έτσι ώστε να υπάρχουν στο άμινο- ή στο καρβοξύ- άκρο οι 6x Ιστιδίνες (6x His). Η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα SDS- πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε η διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν επιτυχώς οι κατασκευές έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pET28a και pQE30 και στη συνέχεια ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με την προσθήκη IPTG. Η ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS- πολυακρυλαμίδης έδειξε πως εκφράζεται η επιθυμητή πρωτεΐνη από τα βακτηριακά κύτταρα αλλά οι αναμενόμενες ζώνες 63kDa και 60kDa για τους φορείς pET28a και pQE30 αντίστοιχα, εμφανίζονται

στο ίζημα και όχι στο υπερκείμενο, γεγονός που καθιστά την πρωτεΐνη μη-υδατοδιαλυτή. Ακολούθησαν διάφορες δοκιμές σχετικά με τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών καλλιεργειών και την επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης (συγκέντρωση IPTG, θερμοκρασία ανάπτυξης), με σκοπό να αυξηθεί το ποσοστό της πρωτεΐνης στο υδατοδιαλυτό κλάσμα ώστε να μπορεί να απομονωθεί η πρωτεΐνη καθαρή και λειτουργική. Τελικά οι εικόνες ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως η μπάντα που αντιστοιχεί στην επιθυμητή πρωτεΐνη εξακολουθεί να υπερισχύει στο ίζημα.

Με σκοπό να διαπιστωθεί αν η ζώνη που παρατηρείται στο ίζημα (pellet) στα 60kDa για το pQE30-CYP71A και στα 63kDa για το pET28A-CYP71A, σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων, υπάρχει και παράγεται η αντίστοιχη πρωτεΐνη ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western. Επιπρόσθετος σκοπός ήταν να ελεγχθεί η περίπτωση να υπάρχει η επιθυμητή πρωτεΐνη στο υπερκείμενο αλλά να μην φαίνεται. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη έγινε επιτυχώς αλλά σήμα δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα. Συμπερασματικά φαίνεται πως η ετερόλογη έκφραση στα βακτήρια δεν καθίσταται εφικτή και πιθανώς να χρειάζονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν από το βακτήριο. Επιπλέον πιθανό θεωρείται και το γεγονός η πρωτεΐνη να είναι τοξική για τα βακτηριακά κύτταρα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται έγκλειστα σωμάτια.

Προτάσεις για τη συνέχιση της πειραματικής εργασίας:

- ✚ Ετερόλογη έκφραση σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως οι ζύμες όπου είναι εφικτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών.
- ✚ Αφού πραγματοποιηθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης να ακολουθήσει η δοκιμή πιθανών υποστρωμάτων στα οποία δρα το ένζυμο και να ανιχνευθούν τα προϊόντα της αντίδρασης.
- ✚ Να πραγματοποιηθεί μελέτη μέσω της μεθόδου του ποσοτικού PCR ώστε να προσδιοριστεί σε ποιους ιστούς δρα το ένζυμο και σε ποιο στάδιο ανάπτυξης.

Περίληψη

Στη παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε η απομόνωση του γονιδίου της ελιάς *CYP450* που κατατάσσεται στα φυτικά κυτοχρώματα, όπου με βάση το ήδη απομονωμένο τμήμα του 5' άκρου, πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της ακολουθίας του 3' άκρου μέσω της τεχνικής 3' RACE-PCR. Το γονίδιο της ελιάς που απομονώθηκε (*CY71A-Olea*) αποτελείται από 1647 βάσεις και φέρει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 1524 βάσεων και 507 αμινοξέων. Εισάγοντας την ακολουθία του γονιδίου στο πρόγραμμα BLASTX για την μετάφραση νουκλεοτιδικών ακολουθιών και την εύρεση των ομόλογων σε πρωτεϊνικό επίπεδο, δείχθηκε πως το γονίδιο συγκαταλέγεται στην οικογένεια 71 και υποοικογένεια A των φυτικών P450, μέλη της οποίας εμπλέκονται κυρίως στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων σε διάφορα φυτικά είδη.

Με στόχο την παραγωγή και την απομόνωση της πρωτεΐνης *CYP71A-Olea* πραγματοποιήθηκε η έκφραση της σε βακτήρια *Escherichia coli*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ετερόλογης έκφρασης, των φορέων έκφρασης pET και pQE. Η ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης έδειξε πως η επιθυμητή πρωτεΐνη παράγεται από τα βακτηριακά κύτταρα αλλά δεν είναι υδατοδιαλυτή, εμφανίζοντας την ζώνη που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης στο ίζημα των δειγμάτων. Πραγματοποιήθηκαν διάφορες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων με σκοπό την απόσπαση της πρωτεΐνης από το ίζημα, αλλά σύμφωνα με τις εικόνες ηλεκτροφόρησης καμία δεν αποδείχθηκε κατάλληλη για την μεταφορά της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο.

Η έκφραση της πρωτεΐνης *CYP71A-Olea* στα βακτήρια *E. coli* εξετάστηκε και μέσω της ανοσοαποτύπωσης κατά western, αλλά σήμα δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα, με αποτέλεσμα να μην καθίσταται εφικτή η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Abstract

Isolation of the full-length cDNA of an *Olea europaea* CYP450 gene, based on a previously identified 5' fragment was achieved in this study via the method of 3' RACE-PCR. The isolated gene of *Olea europaea* (CYP71A- *Olea*) consists of 1647 nucleotides, contains an open reading frame of 1524 nucleotides encoding a polypeptide of 507 amino acid residues. BLASTX analysis has shown that the gene is classified in the family of 71 and in the subfamily A of the plants cytochromes P450, whose members are primarily involved in the biosynthesis of monoterpenes in various plant species.

For the characterisation of the protein CYP71A- *Olea*, expression of the protein in a heterologous system was performed. The CYP71A- *Olea* ORF was cloned into the pET28a and pQE30 expression vectors in bacteria *Escherichia coli*. The desired protein was expressed in both constructs but not in the soluble fraction as seen by the SDS-PAGE analysis. Several growth and induction conditions were tested with the aim to express the protein in the soluble fraction but none of them was proved the suitable.

The expression of the CYP71A- *Olea*, protein, in *E.coli* was examined by western analysis but no signal was detected in any of the samples, so it is difficult to conduct safe conclusions.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Aharoni A, Giri AP, Verstappen FW (2004)** Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell* 16(11):3110–3131
- **Alagna F, D'Agostino N, Torchia L, Servili M, Rao R, Pietrella M, Giuliano G, Chiusano ML, Baldoni L, Perrotta G (2009)**: Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics* 2009, 10:399.
- **Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G, Esposito S, Taticchi A, Rosati A, Rao R, Perrotta G, Servili M, Baldoni L (2012)**: Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*, 12:162
- **Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ (1986)** Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem* 34:823–826
- **Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ (1989)** Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* 28:67–69
- **Antolovich Michael, Prenzler D. Paul, Patsalides Emilios , McDonald Suzanne, Robard Kevin (2002)** Methods for testing antioxidant activity, *The Analyst*, 127
- **Bak Søren, Beisson Fred, Bishop Gerard, Hamberger Björn, Höfer René, Paquette Suzanne, Werck-Reichhart Danièle (2011)** Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* e0144
- **Baldioli M., Servili M., G. Perretti, G.F. Montedoro (1996)** Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 1583–1593.
- **Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (2000)** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000, 68, 457–462
- **Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2007)** Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods—An overview of the last decades, 12, 1679–1719.

- **Bertea CM, Schalk M, Karp F (2001)** Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Arch Biochem Biophys* 390(2):279–286
- **Bianchi G (2003)** Lipids and phenols in table olives. *Eur J Lipid Sci Technol* 105:229–242
- **Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M., Marra, C. (2001)** The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: Hydroxy-isochromans. *Food Chem*, 77, 405–411
- **Bianco, A., Uccella, N. (2000)** Biophenolic components of olives. *Food Res. Int.*, 33, 475–485.
- **Boskou, D (1996).** History and characteristics of the olive tree. In *Olive Oil Chemistry and Technology* . Boskou, D., Ed.; Am. Oil Chem. Soc. Press: Champaign, IL, USA.
- **Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. (2005)** Phenolic compounds in olive oil and olives. *Curr. Top. Nutraceutical Res.* 2005, 3, 125–136.
- **Bozak K.R., Yu H., Sirevag R. and Christoffersen RE (1990)** Sequence analysis of ripening-related Cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, Vol. 87, 3904-3908.
- **Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J.J., Garrido, A.(1999)** Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3535-3540.
- **Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A. (2001)** Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5609–5614.
- **Briante, R., Febbraio, F., Nucci, R. (2003)** Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6975–6981.
- **Buckingham J (2011)** Dictionary of natural products. <http://www.chemnetbase.com>
- **Cardoso SM, Guyot S, Marnet N, Lopes-da-Silva JA, Renard CM, Coimbra MA (2005)** Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 85:21–32
- **Ciafardini, G., Zullo, B.A. (2002)** Microbiological activity in stored olive oil. *Int. J. Food Microbiol.*, 75, 111–118.

- **Clark IM, Forde BG, Hallahan DL (1997)** Spatially distinct expression of two new cytochrome P450s in leaves of *Nepeta racemosa*: identification of a trichome-specific isoform. *Plant Mol Biol* 33(5):875–885
- **Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L (1972)**, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E.coli* by R- factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114
- **Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman AM, van der Heijden R, Verpoorte R, Memelink J (2001)**: Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett*,508(2):215–220.
- **D;Aquils R.T., Gechtel L.J., Videler J.A., Eron J.J., Gorzyoa P. and Kaplan J.C.(1991)**: *Nucleic Acid Res*, 19, 3749
- **Damtoft S, Franzyk H, Jensen SR (1993)** Biosynthesis of secoiridoids in Oleaceae . *Phytochemistry* 34:1291–1299
- **Damtoft S, Franzyk H, Jensen SR (1995)** Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: carbocyclic iridoid precursors. *Phytochemistry* , 40(3):785–792
- **Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005)** Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 105:2253–2278
- **Delgado-Pertinez, M., Gomez-Cabrera, A., Garrido, A. (2000)** Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): Digestibility and chemistry composition and in vitro studies. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 87, 187–201
- **Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K.and Mattick J.S.(1991)** *Nucleic Acid Res*, 19, 4008
- **El-Sayed M, Verpoorte R (2007)** *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochem Rev*6(2–3):277–305
- **Erlich H.A., Gelfand D. and Sninsky J.J.(1991)** Recent advances in the polymerase chain reaction.*Science*, 252, 1643
- **Esti M, Cinquanta L, La Notte E (1998)** Phenolic compounds in different olive varieties. *J Agri Food Chem* 46:32–35
- **Evans WC (2009)** Trease and evans: pharmacognosy, 16th edn.Elsevier, London

- **Fernandez-Escobar, R., Moreno, R., Garcia-Creus, M. (1999)** Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Sci. Hort.-Amsterdam*, 82, 25–45.
- **Frey M., Kliem R., Saedler H., Gierl A. (1995):** Expression of a cytochrome P-450 gene family in maize, *Mol Gen Genet*, 246, 100-108.
- **Galla G, Barcaccia G, Ramina A, Collani S, Alagna F, Baldoni L, Cultrera NG, Martinelli F, Sebastiani L, Tonutti P (2009):** Computational annotation of genes differentially expressed along olive fruit development. *BMC Plant Biol*
- **Garfinkel, D. (1958)** Studies on pig liver microsomes. I.Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77, 493–509.
- **Ghanbari R., Anwar F, Alkharfy K., Gilani A., Saari N. (2012):** Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3291-3340
- **Gomez-Rico A, Fregapane G, Salvador MD (2008)** Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res Inter* 41:433–440
- **Gomez-Rico A, Salvador MD, la Greca M, Fregapane G (2006)** Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J Agric Food Chem* 54:7130–7136
- **Gotoh, O. (1992)** Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 83–90.
- **Goulas V., Charisiadis P., Gerathanassis I.P., Manganaris G.A. (2012),**Classification, Biotransformation and Antioxidant Activity of Olive Fruit Biophenols: A review. *Current bioactive compounds*, 8, 232-239
- **Gucci, R., Lombardini, L., Tattini, M. (1997)** Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol.*, 17, 13–21.
- **Gutierrez-Rosales, F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J., Minguez-Mosquera, MI. (2010)** Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 12924-12933.

- **Hallahan DL, Nugent JH, Hallahan BJ (1992)** Interactions of Avocado (*Persea americana*) Cytochrome P-450 with Monoterpenoids. *Plant Phys* 98(4):1290–1297
- **Hamberger Björn; Bak Søren (2013)**, Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity, *Phil. Trans. R. Soc. B* 2013 368, 20120426
- **Hamdane D, Zhang H, Hollenberg P. (2008)** Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynth Res* 98:657–666
- **Harborne JB (1989)** Methods in plant biochemistry. In: Dey PM, Harborne JB (eds) Series of plant phenolics: volume 1. Academic Press, London, pp 1–28
- **Hofius, D., Sonnewald, U.(2003)** Vitamin E biosynthesis:biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* 2003, 8, 6-9
- **Irmeler S, Schroder G, St-Pierre B, Crouch NP, Hotze M, Schmidt J, Strack D,Matern U, Schroder J (2000):** Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*:new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J* 2000, 24(6):797–804.
- **Jemai H, Bouaziz M, Sayadi S (2009)** Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening. *J Agric Food Chem* 57:2961–2968
- **Jensen, S.R., Franzyk, H., Wallander, E.(2002)** Chemotaxonomy of the Oleaceae: Iridoids as taxonomic markers. *Phytochem.* 2002, 60, 213-231
- **Karakaya, S.E.S.(2009)** Studies of olive tree leaf extract indicate several potential health benefits. *Nutr. Rev.*, 67, 632–639.
- **Khayyal, M.T., El-Ghazaly, M.A., Abdallah, D.M., Nassar, N.N., Okpanyi, S.N., Kreuter, M.H. (2002)** Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*, 52, 797–802.
- **Klingenberg, M. (1958)** Pigments of rat liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 376–386.
- **Le Tutour B., Guedon, D. (1992)** Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds *Phytochem.*, 31, 1173-1178.

- **Lee, O., Lee, B.(2010)** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour. Technol.*, 101, 3751–3754.
- **Lewis F.V. David (2005)**, Guide to Cytochromes P450 Structure and Function, Taylor & Francis e-Library, 2-28
- **Lewis, D.F.V. (1996a)** Cytochromes P450: Structure, Function and Mechanism, Taylor & Francis, London.
- **Li X, Ma D, Chen J et al (2012)** Biochemical characterization and identification of a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. *Plant Sci* 193–194:8595
- **López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M.(2006)** Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico- Biological Interactions*
- **Madsen H.L. & Bertelsen G. (1995)** Review: Spices as antioxidants, *Trends in Food Science & Technology*
- **Mahmoud SS, Croteau RB (2001)** Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *PNAS* 98(15):8915–8920
- **Malik NSA, Bradford JM (2008):** Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food Agriculture and Environment* ,6:8–13.
- **Marsilio V, D'Andria R, Lanza B, Russi F, Iannucci E et al (2006)** Effect of irrigation and lactic acid bacteria inoculants on the phenolic fraction, fermentation and sensory characteristics of olive (*Olea europaea* L. cv. *Ascolana tenera*) fruits. *J Sci Food Agric* 86:1005–1013
- **Mizutani M, Ohta D. (2010)**, Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 291–315.
- **Mizutani M, Ward E, Ohta D (1997)** Plant geraniol/nerol 10-hydroxylase and DNA coding therefor. US Patent
- **Mizutani M; Sato F. (2011)** Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 194–203. (doi:10.1016/j.abb.2010.09.026)

- **Mizutani Masaharu (2012)**, Impacts of Diversification of Cytochrome P450 on Plant Metabolism, The 50th Anniversary and New Horizons of Cytochrome P450 Research:Expanding Knowledge on the Multiplicity and Versatility of P450 and Its Industrial Applications,2012
- **Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini R., Miniati, E., Macchioni A. (1993)**,Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil 3. Spectroscopic characterisations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2228-2234.
- **Montedoro, G.F. (1972)** Phenolic constituents of virgin olive oils. I. Identification of some phenolic acids and their antioxidant capacity. *Sci. Technol. Alimenti.*, 3, 177–186.
- **Montedoro, G.F., Servili, M. (1992)** Tradizione ed Innovazioni Tecnologiche nell Estrazione degli Olii Extravergini Di Oliva; In Proceedings of International Congress “Olive Oil Quality”, Firenze, Italy, 1–3 December; pp. 97–108.
- **Morello J, Motilva M, Tovar M (2004)** Changes in commercial virgin olive oil (cv. Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chem* 85:357–364
- **Morello JR, Romero MP, Motilva MJ (2004):** Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *J Agric Food Chem*, 52(19):6002–6009.
- **Murata J, Roepke J, Gordon H, De Luca V (2008):** The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *Plant Cell* 2008,20(3):524–542.
- **Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA, GlazeBrook J. (2007)** Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13
- **Nelson D.R.(1999)** Cytochrome P450 and the individuality of species *Arch. Biochem. Biophys.*, 369 (1), pp. 1–10
- **Nelson D, Werck-Reichhart D (2011)**, A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.*, 66, 194–211
- **Nelson DR, Ming R, Alam M, Schuler MA (2008).** Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes. *Tropical Plant Biol.*, 1, 216–235.

- **Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S (2004).** Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.*, 135, 756–772
- **O'Connor SE, Maresh JJ (2006)** Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep* 23(4):532–547
- **O'Connor SE, McCoy E (2006)** Chapter one Terpene indole alkaloid biosynthesis. In: John TR (ed) *Integrative plant biochemistry. Recent advances in phytochemistry*, vol 40. Elsevier, Amsterdam, pp 1–22
- **Obied, H.H., Prenzler, P.D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Robards, K. (2008)** Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat. Prod. Rep.*, 25, 1165-1179.
- **Olofsson L, Engstrom A, Lundgren A et al (2011)** Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biol* 11(1):45
- **Omura T (1999):** Forty Years of Cytochrome P450, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 690-698.
- **Ortega-Garcia, F., Peragon, J. (2009)** Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenols oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10331-10340
- **Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000).** Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.*, 38,647–659.
- **Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., B.Andrade, P., Seabra, R.;Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A. (2007)** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive(*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12, 1153–1162.
- **Piperno, A., Toscano, M., Uccella, N.A (2004).** The Cannizzaro-like metabolites of secoiridoid glucosides in some olive cultivars. *J. Sci.Food Agric.*, 84, 341-349.

- **Poulos, T.L., Finzel, B.C. and Howard, A.J. (1986)** Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P450, *Biochemistry*, **25**, 5314–5322.
- **Riachy, M.E., Priego-Capote, F., Leon, L., Rallo, L., de Castro, M.D.L. (2011)** Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 692-707.
- **Ro DK, Paradise EM, Ouellet M (2006)** Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**(7086):940–943
- **Romero C, Garcia P, Brenes M, Garcia A, Garrido A (2002a)** Phenolic compounds in natural black. Spanish olive varieties. *Eur Food Res Technol* **215**:489–496
- **Romero MP, Tovar MJ, Girona J, Motilva MJ (2002b)** Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv . Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *J Agric Food Chem* **50**:5349–5354
- **Rovellini, P., Cortesi, N. (2002)** Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: Aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, **79**, 1–14.
- **Ruano G., Fenton W. and Kidd K.K.(1989)** *Nucleic Acid Res*, **17**, 5407
- **Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K (2003)** Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy’s Mammoth. *J Agric Food Chem* **51**:2532–2538
- **Ryan D, Robards K, Lavee S (1999a)** Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int J Food Sci Technol* **34**:265–274
- **Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. (2003)** Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy’s Mammoth. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2532–2538.
- **Samuelsson, G.** The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea europaea*. *Farmaceutisk Revy* **1951**, **15**, 229–239.

- **Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C. (2002)**, Absorption and Metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother* 56, 276-282.
- **Schuler MA. (2011)** P450s in plant–insect interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 36–45.(doi:10.1016/j.bbapap.2010.09.012)
- **Servili M, Montedoro GF (2002):** Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*,104:602–613
- **Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G (2004):**Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols:agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A*, 1054(1–2):113–127.
- **Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hradolin, A.R., Simoni, M., Knez, Z. (2005)** Phenols proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities.*Food Chem.*, 89, 191–198.
- **Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J.(2000)** Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1013-1023.
- **Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH (1996)** Hemecontaining oxygenases. *Chem Rev* 96:2841–2888.
- **Studier F., Rosenberg A., Dunn J, Dubendorff J (1990)**, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods in Enzymology*, Volume 185, 1990, Pages 60–89
- **Sung PH, Huang FC, Do YY et al (2011)** Functional expression of geraniol 10-hydroxylase reveals its dual function in the biosynthesis of terpenoid and phenylpropanoid. *J Agric Food Chem* 59(9):4637–4643
- **Tasioula-Margari, M.; Ologeri, O. (2001)** Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC/MS. *J. Food Sci.*, 66, 530–534.
- The OLEA EST database: The OLEA EST <http://140.164.45.140/oleaestdb/>
- **Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D.(1992)** Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. *Food Chem.*, 45, 141-144

- **Van Herpen TW, Cankar K, Nogueira M (2010)** *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors. PLoS ONE 5(12):e14222
- **Wang J, Liu Y, Cai Y et al (2010)** Cloning and functional analysis of geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 from *Swertia mussotii* Franch. Biosci Biotechnol Biochem 74(8):1583–1590
- **Yin J., Li G, Ren X, Herrier G (2007)** Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes.
- **Zarzuelo, A.(1991)** Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med.*, 57, 417–419.
- **Διαμαντίδης Γρηγόρης (2007):** Εισαγωγή στη Βιοχημεία, Εκδ: University Studio Press
- **Θέρσιος Ν. Ιωάννης (2005):** *Ελαιοκομία*, Θεσσαλονίκη, Εκδ. Γαρταγάνη